

WALTHER-STRAUB-INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Leitung: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Studien zur Expression und funktionellen Bedeutung von
Geschmacksrezeptoren und dem gustatorischen
Kationenkanal TRPM5 im murinen männlichen
Reproduktionssystem



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Andrea Wartenberg

München

2016

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Betreuerin:	Prof. Dr. rer. nat. Ingrid Boekhoff
Zweitgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Faußner
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	04.04.2017

Für meine Mama

„Kaum zu glauben, wenn ein Traum endlich Laufen lernt und fliegt“

(Casper feat. Kraftklub)

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	4
SUMMARY	7
1 EINLEITUNG	10
1.1 REPRODUKTION	10
1.1.1 HORMONELLE UND ANATOMISCHE ORGANISATION DES MÄNNLICHEN REPRODUKTIONSSYSTEMS	10
1.1.2 DIE KAPAZITIERUNG DER SPERMIEN IM WEIBLICHEN GENITALTRAKT	13
1.1.3 AKROSOMREAKTION	16
1.2 CHEMOSENSORISCHE SINNESWAHRNEHMUNG	19
1.2.1 GUSTATORISCHE REIZWAHRNEHMUNG	20
1.2.2 OLFAKTORISCHE REIZWAHRNEHMUNG	25
1.2.3 EKTOPE EXPRESSION VON CHEMOSENSORISCHEN PROTEINEN	28
1.3 ZIELSETZUNG	33
2 MATERIAL	35
2.1 CHEMIKALIEN	35
2.2 ENZYME, GRÖßENSTANDARDS UND KITS	37
2.3 ANTIKÖRPER	37
2.3.1 PRIMÄRANTIKÖRPER	37
2.3.2 SEKUNDÄRANTIKÖRPER	38
2.4 PRIMER	38
2.4.1 PRIMER FÜR DIE GENOTYPISIERUNG	38
2.4.2 PRIMER FÜR DIE RT-PCR	39
2.4.3 PRIMER FÜR DIE <i>IN SITU</i> RT-PCR	39
2.5 PUFFER	40
2.6 GEBRAUCHSWAREN	42
2.7 GERÄTE	43
2.8 MAUSSTÄMME	44
3 METHODEN	45
3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	45
3.1.1 mRNA ISOLIERUNG AUS UNTERSCHIEDLICHEN GEWEBEN	45
3.1.2 cDNA SYNTHESE	45
3.1.3 VARIANTEN DER PCR	46
3.1.4 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	48
3.2 ARBEITEN MIT MÄUSEN	49
3.2.1 HALTUNG UND ZUCHT	49
3.2.2 GENOTYPISIERUNG	50

3.2.3	SPERMIIENISOLATION AUS DEM NEBENHODEN UND BESTIMMUNG MÄNNLICHER REPRODUKTIONSPARAMETER	51
3.2.4	GEWINNUNG VON SERUM UND PLASMA AUS BLUTPROBEN DER MAUS	52
3.3	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	53
3.3.1	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG VON MURINEN GEWEBE	53
3.3.2	GEWEBEFRAKTIONIERUNG	56
3.3.3	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	57
3.3.4	SDS-PAGE – DISKONTINUIERLICHE SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	57
3.4	REPRODUKTIONS BIOLOGISCHE METHODEN	60
3.4.1	MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNG MÄNNLICHER REPRODUKTIONSORGANE DER MAUS	60
3.4.2	QUANTITATIVE UNTERSUCHUNG DER <i>IN VITRO</i> AUSGELÖSTEN AKROSOMREAKTION	63
3.4.3	ISOLIERUNG UND SOLUBILISIERUNG VON <i>ZONA PELLUCIDA</i>	64
3.4.4	QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER INTRAZELLULÄREN Ca^{2+} -KONZENTRATION IN SPERMIIEN	66
3.4.5	MESSUNG DER INTRAZELLULÄREN cAMP-KONZENTRATION IN SPERMIIEN	67
3.4.6	BESTIMMUNG DES TESTOSTERONSPIEGELS IN SERUM UND PLASMA DER MAUS	70
3.5	STATISTIK	71
4	ERGEBNISSE	72
4.1	EXPRESSION DES Tas2r131 IM MÄNNLICHEN REPRODUKTIONSGEWEBE: STUDIEN ZUR FUNKTIONELLEN ROLLE DES BITTERREZEPTORS FÜR DIE MÄNNLICHE FERTILITÄT	72
4.1.1	SPEZIFITÄTSANALYSE DER GENERIERTEN Tas2r131-SPEZIFISCHEN POLYKLONALEN ANTIKÖRPER	73
4.1.2	ANALYSE DER MÖGLICHEN URSACHE EINER GENOTYPVERSCHIEBUNG IN NACHKOMMEN GESCHLECHTSSPEZIFISCHER HETEROZYGOTER Tas2r131-ZUCHTPAARE	77
4.1.3	QUANTITATIVE UND MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN Tas2r131-DEFIZIENTEN HODENGEWEBE UND SPERMIIEN	83
4.1.4	ANALYSE DER AKROSOMREAKTION IN Tas2r131-DEFIZIENTEN SPERMIIEN	90
4.1.5	INTRAZELLULÄRE KONZENTRATION VON SIGNALBOTENSTOFFEN IN SPERMIIEN	93
4.2	SYNERGISTISCHE AUSWIRKUNGEN DER DELETION GUSTATORISCHER SIGNALPROTEINE FÜR DIE MÄNNLICHE REPRODUKTION	97
4.2.1	TRPM5 EXPRESSION IM MÄNNLICHEN REPRODUKTIONSGEWEBE	98
4.2.2	<i>IN VIVO</i> FERTILITÄTS-ANALYSEN VON TRPM5-DEFIZIENTEN TIEREN	101
4.2.3	FUNKTIONALITÄTSANALYSEN TRPM5-DEFIZIENTER SPERMIIEN	103
4.2.4	ZUCHT-BASIERTE GENERIERUNG VON MAUSLINIEN MIT EINER GLEICHZEITIGEN DELETION DES TRPM5 UND DES UMAMI-REZEPTORS Tas1r1, ODER DES BITTERREZEPTORS Tas2r131	105
4.2.5	FERTILITÄTSANALYSE VON TasR-TRPM5-DEFIZIENTEN MÄUSEN	109
4.2.6	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON TasR-TRPM5-DEFIZIENTEN SPERMIIEN	111
4.2.7	DETAILLIERTE ANALYSEN DER TRPM5- UND TasR-TRPM5-DEFIZIENTEN SPERMIIEN UND IHRER TESTIKULÄREN GENESE	115
4.3	MUPP1 UND OMP: EKTOPE EXPRESSION CHEMOSENSORISCH-ASSOZIIERTER PROTEINE	123
4.3.1	COEXPRESSION VON MUPP1 UND GUSTATORISCHEN SIGNALMOLEKÜLEN	124
4.3.2	OMP-EXPRESSION IN MURINEN LUNGENGEWEBE	128
4.3.3	ANALYSEN ZUR EXPRESSION DES GUSTATORISCHEN SIGNALPROTEINS TRPM5 IN DER LUNGE	134
5	DISKUSSION	139
5.1	DIE FUNKTION GUSTATORISCHER SIGNALMOLEKÜLE IM MÄNNLICHEN REPRODUKTIONSSYSTEM	139

5.1.1	TAS2R131-ABHÄNGIGE FERTILITÄTSANALYSEN	139
5.1.2	REPRODUKTIONS BIOLOGISCHE FUNKTION DES TRPM5 IM ZUSAMMENSPIEL MIT GESCHMACKSREZEPTOREN	146
5.2	EXPRESSION VON MUPP1 UND OMP IN EXTRANASALEN ORGANSYSTEMEN	154
5.2.1	MUPP1 IN GUSTATORISCHEN UND GASTROINTESTINALEN ZELLEN	154
5.2.2	OMP- EIN OLFAKTORISCHES PROTEIN IN DER LUNGE	155
5.3	AUSBLICK	157
5.3.1	FUNKTIONELLER EINFLUSS GUSTATORISCHER SIGNALPROTEINE AUF VORGÄNGE DER MÄNNLICHEN REPRODUKTION	157
5.3.2	MUPP1 UND OMP ALS MÖGLICHE MULTIPROTEINADAPTOREN IN UNTERSCHIEDLICHEN CHEMOSENSORISCHEN ORGANSYSTEMEN	159
<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>		<u>161</u>
<u>ANHANG</u>		<u>183</u>
ABBILDUNGSVERZEICHNIS		183
TABELLENVERZEICHNIS		184
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS		185

Zusammenfassung

Zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten der letzten Jahre haben gezeigt, dass olfaktorische und gustatorische Proteine auch außerhalb der primären Sinnesorgane exprimiert werden. Diese sogenannte ektopische Expression von gustatorischen Signaltransduktionsproteinen wurde in der letzten Dekade auch für das männliche Reproduktionssystem beobachtet. Dabei haben Studien mit verschiedenen *knockout*-Mausmodellen für Geschmacksrezeptoren und dem gustatorischen G-Protein Gustducin gezeigt, dass eine genetische Deletion dieser Proteine tatsächlich zu Fertilisationsdefiziten, und bei bestimmten Gen-Deletionskombinationen sogar zur Sterilität bei den männlichen Tieren führt. Die tatsächliche physiologische Funktion der gustatorischen Signalproteine für die männliche Fertilität ist aber noch weitestgehend ungeklärt.

Die vorliegende Arbeit knüpft an diese und vorangegangenen Studien innerhalb der Arbeitsgruppe an und beschreibt den Reproduktionsphänotyp unterschiedlicher Mausmodelle: Neben einer Gen-defizienten Mauslinie für den Umami-Rezeptor Tas1r1 und den Bitterrezeptor Tas2r131, wurde der Fortpflanzungserfolg einer TRPM5-*knockout* Mauslinie bestimmt. Außerdem wurden Doppel-*knockout* Mäuse für den Tas1r1 und den TRPM5 sowie den Tas2r131 und den TRPM5 hergestellt und auf verschiedene Reproduktionsparameter untersucht. Diese kombinierte Gen-Deletion war bezüglich der noch unbekannten regulatorischen Rolle gustatorischer Signalproteine sinnvoll, da der TRPM5 für die Signaltransduktion des Tas1r1-vermittelten Umami-Geschmacks, aber auch für alle bisher analysierten bitteren Geschmacksstoffe (Tas2R) essentiell ist. Zudem fungiert der TRPM5 als finales Element dieser Kaskade, da er erst nach einer TasR-vermittelten Gustducin-Stimulierung aktiviert wird.

Die Deletion des Tas2r131 zeigte bei den Mäusen nur einen sehr milden Reproduktionsphänotyp, was möglicherweise auf eine Kompensation durch andere Rezeptoren der ca. 30 Mitglieder starken Bitterrezeptorfamilie zu erklären sein könnte. Allerdings haben die Studien an der Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Reportermauslinie gezeigt, dass der genetische Stammbhintergrund einer genmanipulierten Mauslinie einen großen Einfluss auf den Phänotyp der Tiere haben kann. Dies hat sich z. B. in der Anzahl epididymaler Spermien gezeigt, für die an Männchen aus Generationen mit unterschiedlichen C57BL/6N-Stammbhintergründen (max. 96,9 % C57BL/6N) beobachtet wurde, dass die Spermienanzahl im Vergleich zu Tas2r131-Wildtyptieren signifikant erhöht war, während dieser Phänotyp für Männchen der gleichen Mauslinie mit einem fast reinen genetischen Stammbhintergrund (98,4 % C57BL/6N) nicht mehr feststellbar war.

Die bereits beobachtete Genotypverschiebung der Nachkommen von Tas2r131-defizienten Zuchtpaaren scheint allerdings ein Phänomen zu sein, das unabhängig vom Stammbhintergrund der Mäuse auftritt. Dabei zeigte sich, dass die Tas2r131-defiziente Erbanlage signifikant häufiger an die Nachkommen vererbt wurde, als nach Mendelschen Vererbungsgesetzen zu erwarten war. Dieses Ereignis wurde aber immer nur dann beobachtet, wenn das Zuchtmännchen mehr Tas2r131-defiziente Allele besaß als das Zuchtweibchen. Diverse angewandte Analysen zur Klärung der Ursache für diese Geschlechter-gekoppelte Weitergabe der Tas2r131-defizienten Erbanlage, wie z. B. eine veränderte Spermienfunktionalität sowie morphologische Auffälligkeiten der Reproduktionsorgane und Bestimmungen der postnatalen Mortalitätsraten der Jungtiere, erlauben bisher jedoch keinerlei Rückschlüsse auf die Gründe der beobachteten *transmission*

ratio distortion, so dass nun eine Chromosomenanalyse Klarheit über etwaige fehlerhafte meiotische Teilungen während der Keimzellentwicklung bringen muss.

Dem relativ milden Reproduktionsphänotyp der Tas2r131-defizienten Männchen stehen die fertilitätsbezogenen pathophysiologischen Veränderungen der TRPM5-*knockout* Männchen gegenüber. Obwohl für TRPM5-defiziente Zuchtpaare keine Reduzierung in der Anzahl der Nachkommen und auch keine Verlängerung des zeitlichen Intervalls zwischen zwei Würfen sowie eine Änderung der Geschlechtsverteilung der Nachkommen registriert wurde, zeigten TUNEL-Assays, dass die Apoptoserate während der Spermatogenese in TRPM5-defizienten Männchen signifikant erhöht ist. Zudem zeigten weitere Studien an epididymalen Spermien, dass zwar die Anzahl an Spermien im Vergleich zu Wildtyptieren nicht signifikant reduziert ist, was sich auch im Hodengewicht widerspiegelte, dass sich aber epididymale TRPM5-defiziente Spermien durch ein leicht erhöhtes basales Calcium, einen gesteigerten spontanen Verlust des akrosomalen Vesikels und einer veränderten Kopfform auszeichnen. Besonders auffällig waren jedoch, neben der erhöhten Sterberate der TRPM5-*knockout* Jungtiere in den ersten drei Wochen nach der Geburt, die drastisch reduzierten Testosteronlevel in adulten Männchen. In massenspektrometrischen Quantifizierungen von Testosteron im Plasma von TRPM5-defizienten Männchen zeigte sich, dass die Testosteronkonzentration im Vergleich zu Wildtyptieren im Mittel um mehr als 40 % reduziert ist (17 Tiere). Da der TRPM5 im Rahmen dieser Arbeit sowohl in Spermatozyten, Spermatiden und reifen Spermien aber auch in Leydig Zellen nachgewiesen wurde, sind nun weiterführende Analysen zur Funktionalität der Testosteronproduzierenden Leydig Zellen, aber auch quantitative Bestimmungen weiterer reproduktionsrelevanter Hormone notwendig, um so die funktionelle Rolle des TRPM5 z. B. für die Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden Achse aufzuklären.

Die Verpaarungsversuche an, durch spezifische Zuchtansätze generierte, Doppel-*knockout* Mauslinien haben für keine der beiden Mauslinien eine Sterilität oder gravierende Reproduktionseinschränkungen aufgezeigt. Es wurde jedoch, ähnlich wie für Männchen der TRPM5-*knockout* Mauslinie, beobachtet, dass sich Doppel-*knockout* Männchen beider Linien (Tas1r1-TRPM5, Tas2r131-TRPM5) ebenfalls durch eine erhöhte testikuläre Apoptoserate sowie ein vergrößertes Spermienkopfvolumen auszeichnen. Zusätzlich fiel auf, dass Tas1r1-TRPM5 Doppel-*knockout*-Zuchtpaare, im Vergleich zu Wildtyp-Zuchtpaaren, im Mittel ca. 10 Tage länger brauchen, um sich fortzupflanzen und zudem eine stark reduzierte Anzahl epididymaler Spermien aufweisen (Oligospermie). Diese pathophysiologischen Effekte wurden allerdings nicht für die Tas2r131-TRPM5-defizienten Männchen beobachtet. Weiterführende vaginale Plug-Analysen, die Aufschluss über das tatsächliche Kopulationsverhalten der Tas1r1-TRPM5 Doppel-*knockout* Männchen geben können sowie Studien zur Quantifizierung von reproduktionsrelevanten Hormonen, wie Testosteron, Luteinisierendes Hormon, Follikelstimulierendes Hormon und Gonadotropin-Releasing Hormon, sind nun notwendig, um so zu klären, welchen physiologischen Regulationsmechanismus die gustatorischen Signalproteine (Tas1r1, Tas2r131, TRPM5) auf die männliche Fertilität ausüben.

Zusätzlich zu diesen Studien zur Bedeutung gustatorischer Signalproteine für die männliche Reproduktion wurden initiale Untersuchungen zur ektopen Expression des in olfaktorischen Sinneszellen exprimierten Regulatorproteins Multi-PDZ Domänen Protein MUPP1 und des olfaktorischen Markerproteins OMP im Gastrointestinaltrakt und in der Lunge durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass MUPP1 sowohl in Tas2r131- als auch TRPM5-exprimierenden

Geschmackszellen sowie in TRPM5-exprimierenden Zellen der gastrointestinalen „*limiting ridge*“ und der Pylorusdrüsen exprimiert wird. Da MUPP1 aus 13 PDZ-Proteininteraktionsdomänen aufgebaut ist, und für das olfaktorische System bereits beschrieben wurde, dass MUPP1 an der schnellen Desensibilisierung in olfaktorischen Neuronen beteiligt ist, kann aufgrund der beobachteten Colokalisation von MUPP1 mit dem gustatorischen Signalprotein TRPM5 vermutet werden, dass MUPP1 auch in Zellen des Gastrointestinaltrakts eine Multiproteinadapterfunktion zur Rekrutierung von Signalproteinen übernimmt.

Das für Forschungsvorhaben zur eindeutigen Identifizierung von olfaktorischen Sinneszellen eingesetzte OMP wurde im Rahmen dieser Arbeit auch in Zellen des respiratorischen Alveolargewebes nachgewiesen, wobei eine Colokalisation mit der für das olfaktorische System typischen Adenylatzyklase III und dem gustatorischen Ionenkanal TRPM5 registriert wurde. Weitere Analysen zur OMP-mRNA Expression ergaben, dass es sich bei diesen Zellen um AT II-Zellen handeln könnte, wobei zur letztendlichen Identifizierung weitere immunhistologische Untersuchungen mit spezifischen AT II-Zellmarkern notwendig sind. Zusätzlich dazu wurde das OMP in Zellen des Alveolargewebes identifiziert, deren Morphologie darauf hindeutet, dass es sich dabei um Alveolarmakrophagen handeln könnte. Da die Funktion des OMP in olfaktorischen Sinneszellen noch nicht eindeutig geklärt ist, jedoch eine Rolle des OMPs bei regulatorischen Proteininteraktionen diskutiert wird, ist es vorstellbar, dass OMP im respiratorischen System eine ähnliche Funktion übernimmt. Diese Hypothese könnte mit Hilfe noch ausstehender immunhistologischer Colokalisationsstudien mit AT II- und Alveolarmakrophagen-Zellmarkern sowie Interaktionsstudien mit chemosensorischen Signalproteinen überprüft werden.

Summary

In recent years, numerous scientific studies have shown that olfactory and gustatory proteins are not only expressed by the primary sensory organs. Over the last decade ectopic expression of gustatory signaling proteins has been observed in the male reproductive system. These studies, which used different *knockout* mouse-models of taste receptors and the gustatory G-protein gustducin, revealed deficits in fertilization that can be attributed to the deletion of the specific taste protein. In addition, certain combinations of gene deletions can lead to male sterility; however, the actual physiological function of the gustatory signal proteins in male fertility is still not fully understood.

The work in this thesis is based on these preceding studies and on analyses done previously within our working group. It describes the reproductive phenotypes of different mouse models containing taste receptor and gustatory signaling protein *knockout* mutations. The lines tested included a gene-deficient mouse line concerning the umami receptor Tas1r1 and the bitter receptor Tas2r131, as well as an investigation on the reproductive success of a TRPM5 *knockout* mouse line. Additionally, Tas1r1-TRPM5 and Tas2r131-TRPM5 double-knockout mice were generated and tested for various reproduction parameters. With respect to the still unknown role of taste transduction proteins outside the oral cavity, the Tas1r1-TRPM5 and Tas2r131-TRPM5 combined deletions were important because of the role that TRPM5 plays in regulating the perception of umami and bitter taste. In addition, TRPM5 acts as the final element of the taste signaling cascade, since it is only activated after TasR-mediated gustducin stimulation. Mice with a deletion of Tas2r131 showed a very mild reproductive phenotype, which could be due to compensation by any of the 30 member bitter receptor family. However, studies on the Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP} reporter mouse line have shown that the genetic background of genetically modified mice can also have a major impact on the phenotype of the animals. For example, the impact of the genetic background was shown to influence the number of epididymal sperm, as the sperm count of male mice from different generations of C57BL/6N backcrossing (max 96.9 % C57BL/6N) was significantly increased, compared to Tas2r131 wildtype animals. This phenotype was no longer observed in male mice of further genetic backcrossing-generations (98.4% C57BL/6N).

However, the previously noticed shift in genotype distribution among litters of Tas2r131-deficient breeding pairs seems to be a phenomenon that occurs regardless of genetic background. It was found that the Tas2r131-deficient allele was inherited significantly more often, than would be expected by Mendelian inheritance laws. Yet, this anomaly was only observed in cases where male breeding mice possessed more genetic Tas2r131-deficient alleles than breeding females. Various analyses, such as changes in sperm functionality, morphological abnormalities of the reproductive organs and determination of postnatal mortality rates were applied to find an explanation for this sex-related transmission of the Tas2r131-deficient genetic information. However, so far, no conclusions on the cause of the observed *transmission ratio distortion* can be drawn. In future, chromosomal analyses should reveal any potential defective meiotic divisions during germ cell development, in order to be able to explain the deviation from the Mendelian laws.

The relatively mild reproductive phenotype of the Tas2r131-deficient males contrasts with the fertility-related pathophysiological changes of TRPM5-*knockout* males. Even though TUNEL assays on TRPM5-deficient testicular tissue showed significantly more apoptotic events during spermatogenesis, this had no impact on the number of offspring, the time interval between two litters, or the sex ratio of offspring from TRPM5 deficient breeding pairs. Further studies on epididymal sperm indicated that the number of sperm produced by TRPM5-deficient males was not significantly reduced in comparison to wildtype, which was also reflected in testicular weight. However, epididymal TRPM5-deficient sperm can be distinguished by a slightly increased basal calcium, an increased spontaneous loss of the acrosome vesicle and an altered head shape. Particularly striking was the increased mortality rate of TRPM5-*knockout* pups in the first three weeks after birth as well as the massive reduction in adult male testosterone levels. Mass spectrometric quantification of testosterone in plasma of TRPM5-deficient males showed that the concentration of testosterone is reduced compared to wildtype animals by more than 40% (17 animals). Since the TRPM5 has been demonstrated here to be expressed in spermatocytes, spermatids and mature sperm but also in testosterone-producing Leydig cells, further analyses on the function of the Leydig cells, as well as quantitative determinations of other reproductive-related hormones need to be performed to investigate the functional role of TRPM5, for example, in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

Studies on double-*knockout* mice, generated by specific breeding approaches, revealed no sterility or any other serious reproductive limitations for any of the two mouse strains. Similar to TRPM5-deficient males, double-*knockout* males of both lines (Tas1r1-TRPM5, Tas2r131-TRPM5) showed an increased rate of apoptosis and an increased sperm-head volume. Additionally, it was noted that Tas1r1-TRPM5 double-*knockout* breeding pairs need around 10 days longer to reproduce in comparison to wildtype breeding pairs, and had a greatly reduced number of epididymal sperm (oligospermia). These pathophysiological effects, however, were not observed in Tas2r131-TRPM5-deficient males. Further plug-analyses could give information on the actual mating behavior of the Tas1r1-TRPM5 double-*knockout* mice, while studies for the quantification of reproductive relevant hormones, such as testosterone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone, are of urgent need to clarify the function of taste proteins (Tas1r1, Tas2r131, TRPM5) on physiological regulation mechanisms of male fertility.

While these studies highlight the importance of gustatory signaling proteins on male reproduction additional studies on the ectopic expression of regulatory protein multi-PDZ domain protein MUPP1 and the olfactory marker protein OMP, which are normally expressed in olfactory sensory cells, were performed in the gastrointestinal tract and lungs. It was found that MUPP1 is expressed both in Tas2r131- and TRPM5-expressing taste cells and in TRPM5-expressing cells of the gastrointestinal "limiting ridge", as well as in the pylorus. MUPP1 contains 13 PDZ protein interaction domains and has been shown to participate in the rapid desensitization of olfactory neurons. Based on these facts it can be postulated that MUPP1 has a multiprotein adapter function and is involved in the recruitment of signaling proteins, in both the olfactory, gustatory and gastric systems.

The OMP, normally used to uniquely identify olfactory sensory cells, has been demonstrated in this work to also be expressed in respiratory alveolar tissue, where colocalization with the typical olfactory adenylate cyclase III and the gustatory ion channel TRPM5 was observed. Further

analyses of OMP-mRNA expression revealed that these cells could possibly be AT II-cells, however, this must be confirmed by further immunohistological investigations with specific AT II-cell markers. OMP was also identified in a different set of alveolar cells, whose morphology is similar to that of alveolar macrophages. Since the function of OMP in olfactory cells is not yet clarified and a possible role of OMP in regulatory protein-protein interactions has been discussed, it is conceivable that OMP performs a similar function in the respiratory system. This hypothesis could be checked with the help of immunohistological colocalization studies using AT II- and alveolar-cell markers, as well as interaction studies with chemosensory signaling proteins.

1 Einleitung

1.1 Reproduktion

Der Prozess der sexuellen Reproduktion stellt die genetische Diversität einer Spezies sicher und beschreibt die Verschmelzung einer weiblichen und männlichen Gamete (Eizelle und Spermium). Hierbei vereinen sich die beiden, nur mit einem haploiden Chromosomensatz ausgestatteten Keimzellen und bilden eine diploide Zygote, aus der ein neues Lebewesen entstehen kann.

Für eine erfolgreiche Fertilisation muss ein testikulär gebildetes Spermium eine Vielzahl an aufeinanderfolgenden Reifungsschritten im männlichen und weiblichen Genitaltrakt durchlaufen. Die im Männchen ablaufende Spermatogenese und ihre endokrine Regulierung sowie die im Weibchen stattfindenden sekundären Reifungsprozesse der Spermien (Kapazitierung) und die für die Verschmelzung der Keimzellen essentielle Ausschüttung hydrolytischer Enzyme aus dem Akrosom (Akrosomreaktion) stellen wichtige Parameter der männlichen Fertilität dar. Während der Entwicklung eines Spermiums kann die Beeinträchtigung eines oder mehrerer dieser sequentiellen Prozesse zur reduzierten Fertilitätsfähigkeit eines Spermiums führen. Im Folgenden werden daher die Einzelschritte der Spermienreifung und des Fertilisierungsvorgangs detailliert beschrieben.

1.1.1 Hormonelle und anatomische Organisation des männlichen Reproduktionssystems

Die Spermatogenese findet in den männlichen Keimdrüsen, dem paarig angelegten Hoden, statt. Der Prozess der Spermienbildung und Reifung steht unter der neuroendokrinen Kontrolle des Hypothalamus, einem Teil des Zwischenhirns, der als oberstes Kontrollzentrum der hierarchischen Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse für die pulsatile Ausschüttung des Peptidhormons *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) verantwortlich ist (Jin and Yang, 2014; Vadakkadath Meethal and Atwood, 2005). GnRH gelangt nach der Freisetzung aus dem Hypothalamus über die portalen Gefäße des Hypophysenstiels in die Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen) und bewirkt dort die endokrine Freisetzung der Gonadotropine Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikelstimulierendes Hormon (FSH), die dann über die Blutbahnen den Hoden erreichen (Heindel and Treinen, 1989; Seeburg et al., 1987; Vale et al., 1977) (Abbildung 1).

Anatomisch ist der Hoden aus einer Vielzahl von Samenkanälchen (Hodentubuli, *Tubuli seminiferi*) aufgebaut, die jeweils durch Zellzwischenräume (Interstitium, *Interstitium testis*) voneinander getrennt sind. In den Interstitien des Hodens befinden sich Blutgefäße, Nervenfasern, vereinzelte Makrophagen und Lymphozyten sowie die häufig die Blutkapillaren umschließenden Leydig Zellen, denen eine zentrale endokrine Funktion im Hoden zukommt. Leydig Zellen exprimieren Rezeptoren für LH, die zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) gehören. Nach der Bindung eines Agonisten induzieren LH-Rezeptoren über eine Erhöhung der cAMP-Konzentration die Synthese des Hormons Testosteron in den Leydig Zellen (Saez, 1994; Svechnikov et al., 2010). Das Hormon Testosteron ist ein androgenes Steroid, das in den Hodentubuli zur Differenzierung der männlichen Keimzellen in reife Spermien beiträgt. Hohe Konzentrationen an Testosteron oder dem Testosteron Metaboliten Dihydrotestosteron (DHT) wirken inhibierend auf den Hypothalamus (Bagatell et al., 1994), so dass es zu einer Reduktion der GnRH-Ausschüttung kommt. Diese negative Rückkopplung

verursacht anschließend eine geringere LH- und FSH-Sekretion durch den Hypophysenvorderlappen (Jin and Yang, 2014) und dadurch eine Reduktion der Testosteronsynthese (Abbildung 1).

In den Hodentubuli befinden sich, neben den Keimzellen, auch die sogenannten Sertoli-Zellen, die als Stützzellen der Samenkanälchen dienen (Griswold, 1998) und die Blut-Hoden-Schranke bilden (Cheng et al., 2010). Die Blut-Hoden-Schranke fungiert in den Hodentubuli als Barriere zwischen den basal gelegenen Spermatogonien und den weiter im Inneren der Tubuli gelegenen Spermatozyten bzw. den luminal gelegenen Spermatisden (Cheng et al., 2010; Setchell, 2008; Setchell and Waites, 1970). Durch die Blut-Hoden-Schranke wird ein spezifisches Milieu für die Meiose und die Spermatogenese aufrechterhalten und gleichzeitig die reifen, haploiden Spermien vom eigenen Immunsystem separiert (Johnson, 1970). Die Sertoli Zellen werden zum einen von dem Hypophysenhormon FSH angeregt das Hormon Inhibin auszuschütten, das eine negative Rückkopplung auf die Adenohypophyse bewirkt und damit die Sekretion von FSH reguliert (Griswold, 1998). Zum anderen induziert das FSH die Sezernierung des Androgen-bindenden Proteins (engl.: *androgen binding protein*; ABP) aus den Sertoli Zellen, das das Hormon Testosteron bindet und in den Hodenkanälchen anreichert, wodurch die Spermatogenese stimuliert wird (Happ, 1992; Heindel and Treinen, 1989; Sofikitis et al., 2008) (Abbildung 1).

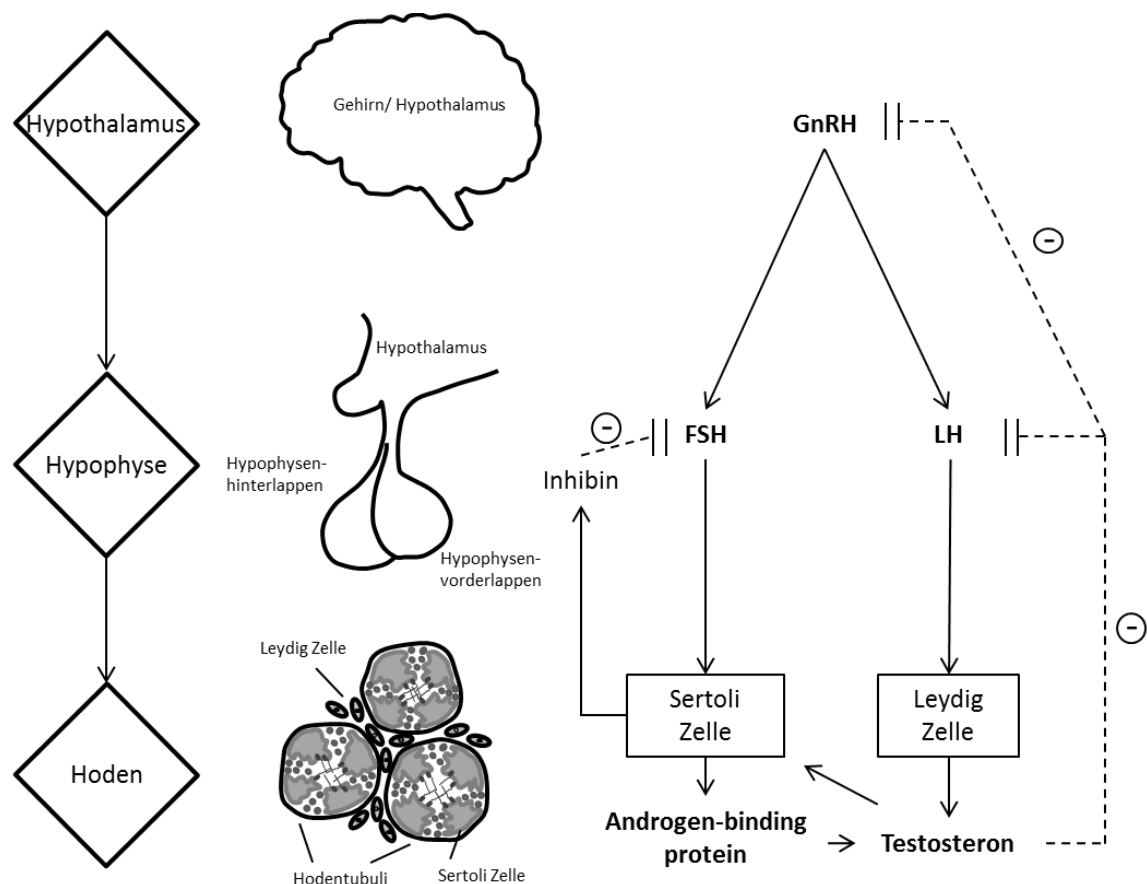


Abbildung 1: Regulation der Freisetzung männlicher Sexualhormone. Die männliche Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden Achse reguliert die endokrine Freisetzung der männlichen Sexualhormone GnRH, FSH und LH und den durch diese ausgeübten Einfluss auf die Testosteronsynthese und damit die Spermatogenese im Hoden. Im Hypothalamus wird das GnRH synthetisiert und durch dessen Freisetzung die Sekretion der Peptidhormone FSH und

LH aus der Hypophyse stimuliert. FSH regt die Sertoli Zellen in den Hodenkanälchen zur Unterstützung der Samenreifung an, während LH die Synthese und Freisetzung von Testosteron aus den Leydig Zellen des Hodens fördert. Die Bildung und Ausschüttung der Hormone FSH und LH wird durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert, wobei ein erhöhter Testosteronspiegel zentral die Freisetzung von GnRH hemmt. Eine direkte Beeinflussung der FSH- bzw. LH-Ausschüttung ist jedoch auch durch Inhibin (FSH), das von den Sertoli Zellen sezerniert wird, oder Testosteron (LH) möglich.

Die in den Hodentubuli stattfindende Spermatogenese der männlichen Keimzellen spiegelt sich durch konzentrisch verteilte Entwicklungsstadien wider und beginnt bei den im Tubulus peripher gelegenen Keimzellen. Im weiteren Verlauf der Spermienbildung schreiten die Entwicklungsstadien der Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatiden bis in das Innerste des Tubulus voran, in dessen Lumen die differenzierten, aber noch unreifen und nicht befruchtungskompetenten Spermien entlassen werden (de Kretser et al., 1998) (Abbildung 3).

Das Spermium ist eine hochgradig spezialisierte Zelle, die sich durch den weiblichen Genitaltrakt hindurch aktiv bewegen kann und deren Funktion es ist die weibliche Keimzelle (Eizelle) zu befruchten. Ein Spermium ist strukturell in einen Kopf mit dem Nukleus, dem eine vesikuläre, akrosomale Struktur aufsitzt, und einen Schwanz (Flagellum) gegliedert (Abbildung 2). Der Nukleus ist der Träger des haploiden Chromosomensatzes, wohingegen das Flagellum die motorische Einheit für die Bewegung der männlichen Keimzelle darstellt (Lefièvre et al., 2009).

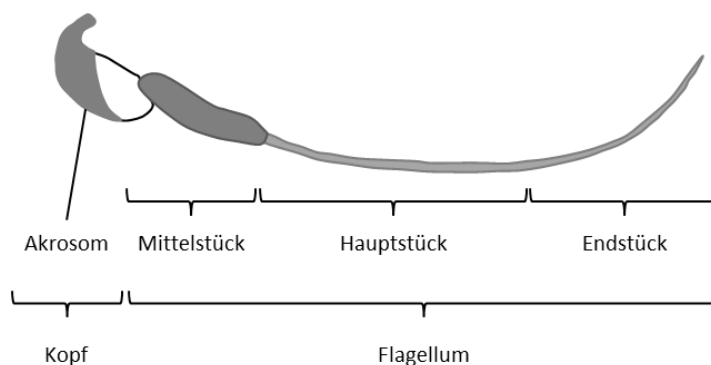


Abbildung 2: Morphologie eines murinen Spermiums. Begeißelte Spermien werden anatomisch in Kopf und Flagellum untergliedert. Der Kopfteil ist Träger des haploiden Chromosomensatzes im Zellkern und wird zu großen Teilen von einer enzymhaltigen, vesikulären Struktur, dem Akrosom, ummantelt. Das Flagellum stellt die motorische Einheit der Zelle dar und kann in das mitochondrienreiche Mittelstück und das Haupt- und Endstück untergliedert werden.

Von dem Lumen des Samenkanälchens aus gelangen die immotilen und noch nicht befruchtungskompetenten Spermien in die Konvolute des Nebenhodens (*Epididymis*), der sich in den Nebenhodenkopf (*Caput epididymis*), Nebenhodenkörper (*Corpus epididymis*) und den Nebenhodenschwanz (*Cauda epididymis*) untergliedert (Abbildung 3). Während des passiven Transports der Spermien durch die ersten beiden epididymalen Abschnitte wird der erste Reifungsprozess der Gameten durch Proteine, die vom Nebenhodenepithel sezerniert werden, ausgelöst (Hamamah and Gatti, 1998; Jones, 1999). Die sich aufgrund dieses Vorgangs entwickelnde progressive Motilität der Spermien ermöglicht es den Keimzellen aktiv in den caudalen Abschnitt des Nebenhodens zu schwimmen. Dort werden die männlichen Keimzellen in einem immotilen Zustand gespeichert, bis sie aufgrund einer Ejakulation durch den Samenleiter (*Ductus deferens*) in den weiblichen Genitaltrakt gelangen (Cornwall, 2009; Hamamah and Gatti, 1998) (Abbildung 3).

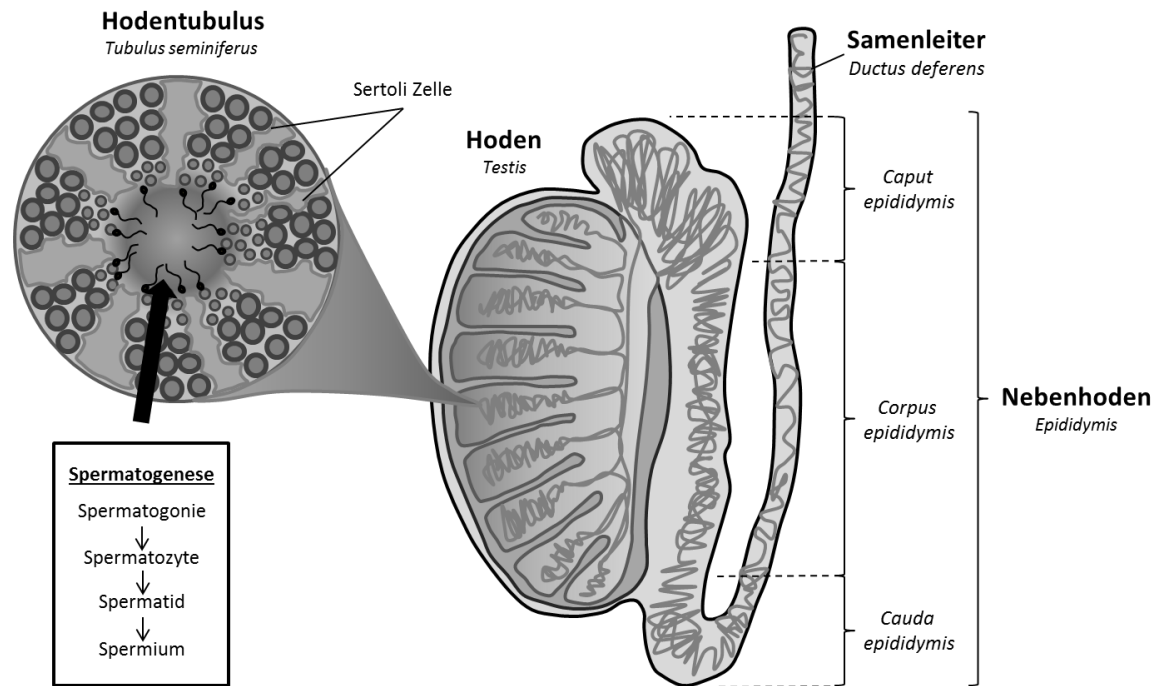


Abbildung 3: Anatomischer Aufbau des Hodens und Nebenhodens der Maus und Keimzellentwicklungsstadien während der Spermatogenese. Der Hoden (*Testis*) ist aus vielen einzelnen Tubuli (*Tubuli seminiferi*) aufgebaut, in denen die einzelnen Entwicklungsschritte während der Spermatogenese stattfinden. Die Entwicklung der Gameten erfolgt vom äußeren, basalen Epithel in Richtung der Tubulusmitte und wird von den zwischen den Keimzellen gelegenen Sertoli Zellen unterstützt. Am Ende der Spermatogenese gelangen die immotilen und noch nicht befruchtungskompetenten Spermien in den Nebenhoden (*Epididymis*) und werden dort passiv durch die einzelnen Abschnitte des Nebenhodenkopfes (*Caput epididymis*) und Nebenhodenkörpers (*Corpus epididymis*) transportiert und anschließend im Nebenhodenschwanz (*Cauda epididymis*) bis zur Weiterleitung in den Samenleiter (*Ductus deferens*) gespeichert (Modifiziert nach Encyclopaedia Britannica, 2010).

1.1.2 Die Kapazitierung der Spermien im weiblichen Genitaltrakt

Das Ziel der sexuellen Reproduktion ist die erfolgreiche Befruchtung einer Eizelle durch eines der vielen Millionen Spermien, die durch eine Ejakulation in den weiblichen Genitaltrakt abgegeben werden. Auf dem Weg der männlichen Keimzellen zur befruchtungsbereiten Oozyte im ampullären Bereich des Eileiters (Ovidukt) (Abbildung 4) werden aufgrund natürlicher Selektionsmechanismen avitale, immotile und pathologische Spermien aussortiert. Dadurch erfolgt eine graduelle Reduzierung der Anzahl potenter Spermien, so dass von den ursprünglich mehreren Millionen Spermien nur wenige Tausend im Eileiter ankommen. Von diesen Spermien wiederum befruchtet in der Regel nur eine einzige männliche Keimzelle die weibliche Gamete (Baillie et al., 1997; Eisenbach and Giojalas, 2006; Pacey et al., 1995; Suarez and Pacey, 2006).

Analog zum Nebenhoden wird die Spermienfunktion im weiblichen Genitaltrakt durch die Zusammensetzung des extrazellulären Milieus bestimmt. Durch das im Ejakulat befindliche Seminalplasma (pH 6,7-7,4) wird der vaginale, saure pH-Wert neutralisiert (Babcock and Pfeiffer, 1987; Suarez and Pacey, 2006). Die Erhöhung des zytosolischen pH-Werts und gesteigerte Ca^{2+} - und Na^{+} -Konzentrationen führen in den Spermien zur sogenannten Hypermotilität. Die erhöhte Frequenz der Flagellenschläge hilft den Spermien, den zähflüssigen Zervixschleim zu durchdringen. Dadurch findet bereits kurz nach der Ejakulation die erste Selektion der männlichen Keimzellen statt, da nur äußerst vitale und aktive Spermien in den Uterus gelangen

und schließlich den Isthmus im Eileiter erreichen (Eisenbach and Giojalas, 2006; Hamamah and Gatti, 1998; Suarez and Pacey, 2006). Im Bereich des proximalen Ovidukts heften sich die Spermien nun an das auskleidende Epithel und durchlaufen dort mit der Kapazitierung den zweiten Reifungsprozess, ohne den die Spermien keine Befruchtungskompetenz besitzen (Fraser, 2010) (Abbildung 4). Der Begriff „Kapazitierung“ umfasst eine Reihe molekularer Prozesse, wie den Anstieg des intrazellulären pH-Werts, eine Kalium-abhängige Hyperpolarisation, die zytosolische Konzentrationserhöhung der *second messenger* Ca^{2+} und cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) sowie zahlreiche Proteinphosphorylierungen und eine Veränderung der Membranfluidität (De Jonge, 2005; Suarez and Pacey, 2006; Visconti et al., 2011).

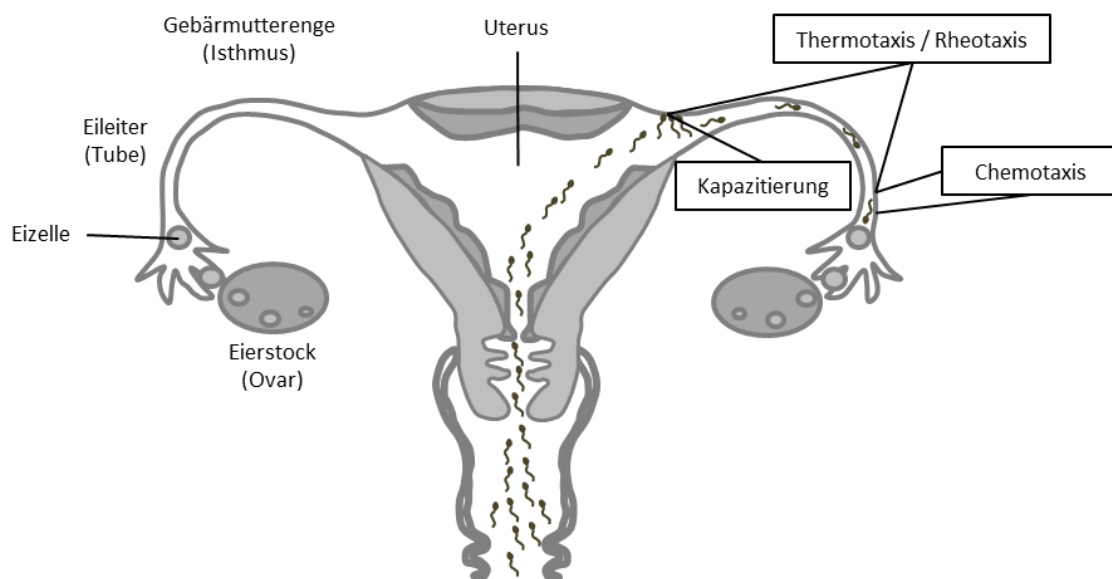


Abbildung 4: Spermienreifung und mögliche Mechanismen der Wegfindung zur Eizelle im weiblichen Genitaltrakt. Die schematische Zeichnung zeigt den weiblichen Genitaltrakt und, durch eingezeichnete Spermien, den Weg, den die männlichen Keimzellen bis zum Erreichen der Oozyte zurücklegen müssen. Eine Vielzahl an ejakulierten Spermien wandert im weiblichen Genitaltrakt in den Uterus und von dort zum Isthmus, wo der sekundäre Reifungsprozess, die Kapazitierung, stattfindet. Die anschließend befruchtungskompetenten männlichen Keimzellen finden den Weg zur Eizelle im ampullären Bereich des Eileiters vermutlich über thermotaktische, rheotaktische und chemotaktische Mechanismen (Modifiziert nach Eisenbach & Giojalas, 2006).

Während der Verweildauer der Spermien am auskleidenden Epithel des Isthmus kommt es zu einem Anstieg des pH-Werts in den Spermien, der zu einer Aktivierung der spermien-spezifischen und K^+ -leitenden SLO3-Kanäle und zur charakteristischen Hyperpolarisation führt (Carr and Acott, 1989; Lishko et al., 2010; Navarro et al., 2007). Parallel dazu findet durch den spermien-spezifischen und im Mittelstück des Flagellums lokalisierten Ca^{2+} -Kanal CatSper (engl.: *cation channels of sperm*) eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration statt (Baldi et al., 1991; Chavez et al., 2014; Visconti and Kopf, 1998). Ca^{2+} und das in der folliculären Flüssigkeit enthaltene Hydrogencarbonat, welches durch $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Cotransporter und/oder Natrium/Protonen-Austauscher in die Keimzelle gelangt (Demarco et al., 2003; Liu et al., 2012a), ermöglichen die enzymatische Umsetzung von ATP (Adenosintriphosphat) in cAMP durch die

Aktivierung einer löslichen Adenylatzyklase (Chen et al., 2000; Demarco et al., 2003; Dessauer and Gilman, 1996; Litvin et al., 2003). Die ansteigende Konzentration von cAMP aktiviert anschließend die Proteinkinase A (PKA), die Tyrosinkinasen stimuliert, so dass es zu vermehrten Proteinphosphorylierungen kommt, die die Hyperaktivität auslösen (Leclerc et al., 1996; Naz and Rajesh, 2004; Nolan et al., 2004; Salicioni et al., 2007; Visconti et al., 1995a; Visconti et al., 1995b). Ein weiteres cAMP- und PKA-abhängiges Merkmal der Kapazitierung ist das sogenannte *Phospholipid-Scrambling*. Hierbei wird die Membranfluidität durch die Extraktion des Cholesterols aus der Membran erhöht und dadurch intrazelluläre Signalwege in den Spermien moduliert (Eliasson, 1966; Flesch et al., 2001; Gadella and Harrison, 2000; Jones et al., 2010; Travis and Kopf, 2002).

Der Prozess der Kapazitierung kann *in vitro* nachgeahmt werden, indem Spermien in einem Puffer inkubiert werden, der Ca^{2+} , BSA (bovines Serumalbumin) und Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) enthält. Nach einer Verweildauer in diesem Puffer lassen sich auch in diesen Spermien die typischen Charakteristika der Kapazitierung (Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} - und cAMP-Konzentration, Auslagerung von Cholesterol, vermehrte Proteinphosphorylierungen etc.) nachweisen (Baldi et al., 1991; Carr and Acott, 1989; de Lamirande et al., 1997; Yanagimachi, 1994).

Bis zum Abschluss des Kapazitierungsprozesses fungiert der Isthmus als Speicherort der männlichen Keimzellen. Als Folge dieser sekundären Reifung sind ausschließlich die vollständig kapazitierten Spermien befruchtungskompetent und ausreichend motil, um die zu überbrückende Distanz zur Eizelle zurückzulegen (De Jonge, 2005; Suarez and Pacey, 2006) (Abbildung 4). Während der Kapazitierung findet durch den Spermien-spezifischen, ionotropen CatSper-Kanal ein Ca^{2+} -Einstrom statt, der zur Hyperaktivierung der Spermien führt (Qi et al., 2007; Singh and Rajender, 2015). Mit Hilfe der nun kräftigen und peitschenartigen Flagellenschläge können sich die Spermien vom Epithel des Isthmus ablösen und den letzten Abschnitt des Eileiters zur Eizelle durchqueren (Ackermann et al., 2008; Kirichok et al., 2006; Lishko et al., 2010; Lishko et al., 2011; Ren et al., 2001; Suarez et al., 1991). Wie die CatSper-*knockout*-Mäuse sind auch diejenigen Männer unfruchtbar, die eine Mutation in ihrem CatSper-Gen tragen. CatSper-Kanäle sind also auch beim Menschen essentiell für die Befruchtung (Avidan et al., 2003; Carlson et al., 2009; Hildebrand et al., 2010; Navarro et al., 2008; Qi et al., 2007; Quill et al., 2003; Singh and Rajender, 2015; Zhang et al., 2007).

Doch wie können Spermien eine derart lange Distanz überwinden und trotzdem genau die Eizelle erreichen? Spermien stellen eine der wenigen sich aktiv bewegenden Zellpopulationen dar, die zusätzlich die Fähigkeit besitzen sich anhand äußerer Reize (Temperatur, Konzentration chemischer Stoffe, Flüssigkeitsströmungen) fortzubewegen. Die Hypothese einer thermotaktischen Reaktion von Spermien erscheint aufgrund von in Kaninchen (David et al., 1971) und Schweinen (Hunter and Nichol, 1986) gemessenen Temperaturunterschieden zwischen dem Isthmus und der Ampulle des Eileiters möglich. Diese Theorie wurde durch Studienergebnisse unterstützt, die zeigten, dass kapazitierte Spermien von Kaninchen und Menschen auf geringe Temperaturerhöhungen mit einem verstärkten Flagellenschlägen reagieren (Bahat et al., 2003; Boryshpolets et al., 2015). Die Temperatur-abhängige Orientierungsreaktion der Spermien stellt eine mögliche Form der Wegfindung auf der langen Distanz zwischen Isthmus und Ampulle dar, über die ein Konzentrationsgradient eines potentiellen Lockstoffs nicht aufrecht erhalten werden könnte (Bahat and Eisenbach, 2006; Bahat and Eisenbach, 2010; Miki and Clapham, 2013). Eine weitere taktische Orientierungshilfe,

die über größere Entfernungen angewendet werden könnte, könnten Flüssigkeitsströmungen im weiblichen Genitaltrakt darstellen, die direkt nach dem Koitus induziert werden und so die Spermien zur Eizelle leiten könnten (Battalia and Yanagimachi, 1979; Miki and Clapham, 2013). Die gerichtete Orientierung einer beweglichen Zelle aufgrund von Flüssigkeitsströmungen wird dabei als Rheotaxis bezeichnet und kann u. a. durch Gewebekontraktionen hervorgerufen werden. In unmittelbarer Nähe der zu befruchtenden Eizelle könnten dann chemoattraktive Stoffe (Aminosäuren, Hormone) als Orientierungshilfe von den Spermien wahrgenommen werden (Bahat and Eisenbach, 2010; Bahat et al., 2005; Bahat et al., 2003). Forschungsergebnisse haben bereits gezeigt, dass Cumuluszellen, die die Eizelle umgeben, chemotaktisch-aktive Substanzen synthetisieren und sezernieren (Garbers, 2001; Sun et al., 2005). Außerdem wurde festgestellt, dass das während des Eisprungs freigesetzte Hormon Progesteron aktivierend auf den CatSper-Kanal wirkt und dadurch den Trigger für die Hyperaktivierung der Spermien darstellt (Brenker et al., 2012; Guidobaldi et al., 2008; Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011). Daher wird zur Zeit angenommen, dass Spermien nach der Kapazisierung *in vivo* die lange Strecke bis zum Ort der Befruchtung über einen Temperaturgradienten, Flüssigkeitsströmungen und Kontraktionen des Eileiters zurücklegen und schließlich im Bereich der distalen Ampulle durch Lockstoffe zur Eizelle geleitet werden (Miki and Clapham, 2013).

1.1.3 Akrosomreaktion

Sobald ein Spermium eine Eizelle erreicht, durchläuft dieses die Akrosomreaktion. Das Akrosom, das aus vesikulären Abschnürungen des Golgi-Apparates entsteht, liegt auf dem Nukleus des Spermienkopfes auf und stellt ein mit hydrolysierenden Enzymen (z. B. Akrosin, Hyaluronidase) gefülltes Vesikel dar (Escalier et al., 1991; Florman et al., 2008; Kierszenbaum et al., 2007; Kim et al., 2008). Nach Erreichen der Eizelle führt das Spermium die irreversible Akrosomreaktion durch, während der es zur Verschmelzung der Plasmamembran und der äußeren akrosomalen Membran kommt (Abbildung 5). Die bei dieser Exozytose freigesetzten hydrolysierenden Enzyme können die stark vernetzte Glykoproteinhülle der Eizelle, die *Zona pellucida* (in murinen Eizellen aus den Glykoproteinen ZP1, ZP2 und ZP3 bestehend), destabilisieren (Bleil and Wassarman, 1980; Bleil and Wassarman, 1983; Clark and Dell, 2006; Yanagimachi and Usui, 1974). Nach dieser speziellen Exozytosereaktion wird die innere akrosomale Membran zur „neuen“ Plasmamembran, so dass das Spermium in direkten Kontakt mit der freigelegten Plasmamembran der Eizelle treten kann (Kierszenbaum, 2000; Monroy, 1985; Wassarman and Litscher, 2008). In dieser „neuen“ Plasmamembran des Spermiums wurde bereits vor einigen Jahren das Membranprotein *Izumo* entdeckt, das nach einem japanischen Hochzeitsschrein benannt wurde und das für die Befruchtung der Oozyte essentiell ist (Tanihara et al., 2014; Vjugina and Evans, 2008). Im Jahr 2014 gelang es nun auch den potentiellen *Izumo*-Rezeptor *Juno* (benannt nach der römischen Göttin der Ehe und Geburt) auf der Eizelle zu identifizieren und zudem zu zeigen, dass eine Fusion von Eizelle und Spermienzelle beim Fehlen von *Izumo* und *Juno* ausbleibt (Bianchi et al., 2014).

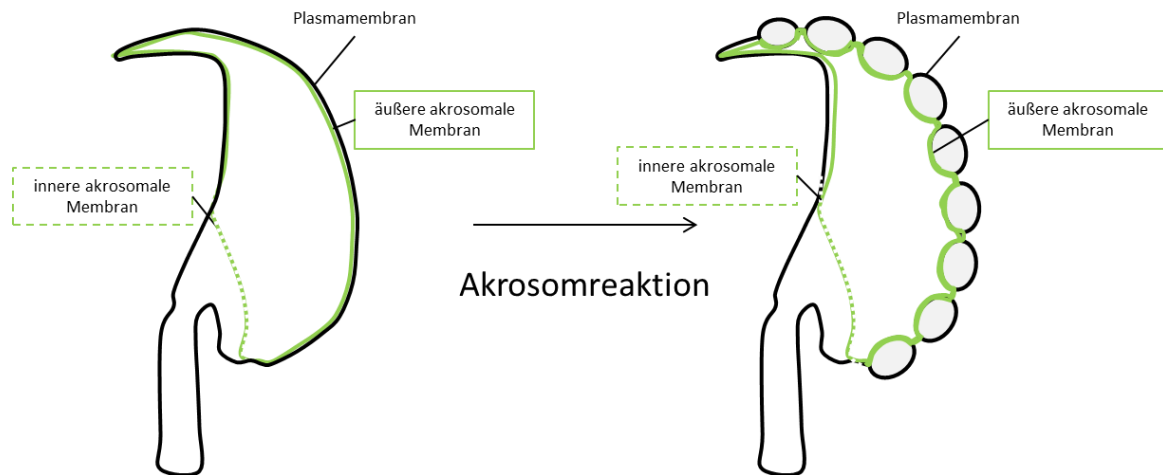


Abbildung 5: Membranfusion während der Akrosomreaktion. Im Kopfbereich des Spermiums liegt das Akrosom kappenartig dem Nukleus auf und wird durch die innere akrosomale Membran (grün gestrichelte Linie) und die äußere akrosomale Membran (grüne Linie) begrenzt. Über die äußere akrosomale Membran erstreckt sich die Plasmamembran, die während der Akrosomreaktion mit der äußeren akrosomalen Membran verschmilzt. Da die Membranfusion nur an einzelnen Kontaktstellen zwischen beiden beteiligten Membranen erfolgt, entstehen dabei hunderte von Pseudovesikeln, was gleichzeitig dazu führt, dass die gespeicherten akrosomalen Enzyme durch die dabei entstehenden Zwischenräume freigesetzt werden. Durch diesen Vorgang wird der partielle Abbau der *Zona pellucida* der Eizelle ermöglicht.

Während es durch die Arbeiten an *Izumo* und *Juno* in den letzten Jahren gelungen ist, die Erkennungsproteine für die Initiierung der finalen Verschmelzung zwischen Spermium und Eizelle zu identifizieren, ist bis *dato* jedoch nicht abschließend geklärt, welcher molekulare Trigger die Akrosomreaktion tatsächlich auslöst. Obwohl einige Untersuchungen zeigten, dass die isolierte *Zona pellucida* die Akrosomreaktion auslösen kann (Buffone et al., 2009; Florman et al., 2008; Gadella, 2012; Okabe, 2013), wurde in anderen Forschungsarbeiten beschrieben, dass die die Eizelle umgebende Granulosaschicht (*Cumulus oophorus*) ebenfalls einen positiven Trigger für die akrosomale Exozytosereaktion darstellt (Jin et al., 2011; Yanagimachi, 2011).

Die Beantwortung der Frage nach dem tatsächlichen physiologischen Auslöser für die Akrosomreaktion wird u. a. dadurch erschwert, dass das Erkennungsprotein für mögliche Akrosomreaktion-auslösende Liganden auf der Plasmamembran des Spermiums bislang noch nicht eindeutig identifiziert werden konnte (Chiu et al., 2014; Gadella, 2012; Jin et al., 2011). Als mögliche Kandidaten zur Erkennung von Proteinen zur Auslösung der Akrosomreaktion werden zur Zeit u. a. Polysaccharid-bindende Moleküle (β -1,4-Galaktosyltransferase, β -Mannosidase, sp56, Zonadhesin) (Chiu et al., 2014; Nixon et al., 2007; Sutovsky, 2009), aber auch GPCRs (Florman et al., 2008) diskutiert.

Ungeachtet des exakten Auslösemechanismus für die Akrosomreaktion ist der Signaltransduktionsweg, der zur Verschmelzung der Plasmamembran mit der äußeren akrosomalen Vesikelmembran führt, besser verstanden (Darszon et al., 2011; Mayorga et al., 2007) (Abbildung 6). Die Signaltransduktion erfolgt durch zwei aufeinanderfolgende, intrazelluläre Ca^{2+} -Wellen, wobei die erste Phase kurz und transient verläuft, während die zweite Welle einen langanhaltenden Ca^{2+} -Einstrom darstellt (Arnoult et al., 1999; Breitbart, 2002b; Rahman et al., 2014). Als verantwortliche Ionenkanäle für diesen Einstrom von Ca^{2+} werden

gegenwärtig entweder der Spermien-spezifische CatSper-Kanal oder nicht-selektive Kationen-Kanäle diskutiert.

Dabei wird bei der CatSper-abhängigen Erklärung postuliert, dass es durch die *Zona*-Bindung an einen noch unbekannten Rezeptor zur Aktivierung eines $G_{i/o}$ Proteins und zur Alkalisierung des Spermiums kommt. Durch die Veränderung des intrazellulären Säure-Base-Haushalts wird der pH-sensitive CatSper-Kanal im Flagellum aktiviert, wodurch sich die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bis in den Kopfbereich des Spermiums ausbreitet und dort die Akrosomreaktion auslöst (Kirichok et al., 2006; Xia and Ren, 2009). Die zweite Hypothese wird durch experimentelle Beobachtungen belegt, die zeigen, dass durch die Bindung der *Zona pellucida* an das Spermium nicht-selektive Kationen-Kanäle aktiviert werden, wodurch es zur Depolarisation der Zelle kommt. Infolgedessen werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (Ca^{2+}_v) geöffnet, die durch den dadurch ermöglichten Ca^{2+} -Influx in das Spermium, die Depolarisation noch verstärken (Chan et al., 1997; Darszon et al., 2006; Wennemuth et al., 2000). *In vivo* könnten auch beide Vorgänge parallel ablaufen und so für die Sicherstellung der erfolgreichen Exozytosereaktion sorgen (Darszon et al., 2011).

Im Anschluss an den kurzfristigen Ca^{2+} -Einstrom, wird das für den Prozess der Membranfusion notwendige Ca^{2+} , durch die Aktivierung einer G-Protein-abhängigen Phospholipase und eines in der akrosomalen Membran lokalisierten Inositoltriphosphat-Rezeptors (IP_3R) bereitgestellt (Fukami et al., 2003; Roldan et al., 1994; Roldan and Shi, 2007; Walensky and Snyder, 1995). Dieser langanhaltende akrosomale Ca^{2+} -Efflux wird zusätzlich durch die Aktivierung des in der äußeren akrosomalen Membran lokalisierten Ca^{2+} -Kanals TPC1 (engl.: *two pore channel 1*) getragen (Arndt et al., 2014). Darüber hinaus wird der langanhaltende Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle durch den vermehrten Influx von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellularraum über STIM/ORAI- (engl.: *stromal interaction molecule*; ORAI: Komponente der *Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels* (CRAC)) oder TRPC- (engl.: *transient receptor potential*) Kanäle verstärkt (Darszon et al., 2011; O'Toole et al., 2000).

Durch die Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung kommt es zu einer positiven Rückkopplung, die eine Aktivierung der löslichen Adenylatzyklase (engl.: *soluble adenylylase*; sAC) bewirkt (Litvin et al., 2003; Steegborn et al., 2005). Der, durch die sAC katalysierte, vermehrte Abbau von Adenosintriphosphat zu cAMP, verursacht eine cAMP-abhängige Aktivierung des Austauschproteins EPAC (engl.: *exchange protein directly activated by cAMP*). Dieses Protein vermittelt, gemeinsam mit niedermolekularen GTPasen der Ras-Familie und SNARE- (engl.: *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor*) Membranfusionsproteinen, die finale Fusion der Plasmamembran und der äußeren akrosomalen Membran (Branham et al., 2009; Branham et al., 2006; Breckler et al., 2011; Ramalho-Santos et al., 2002; Tomes et al., 2005; Tomes et al., 2002).

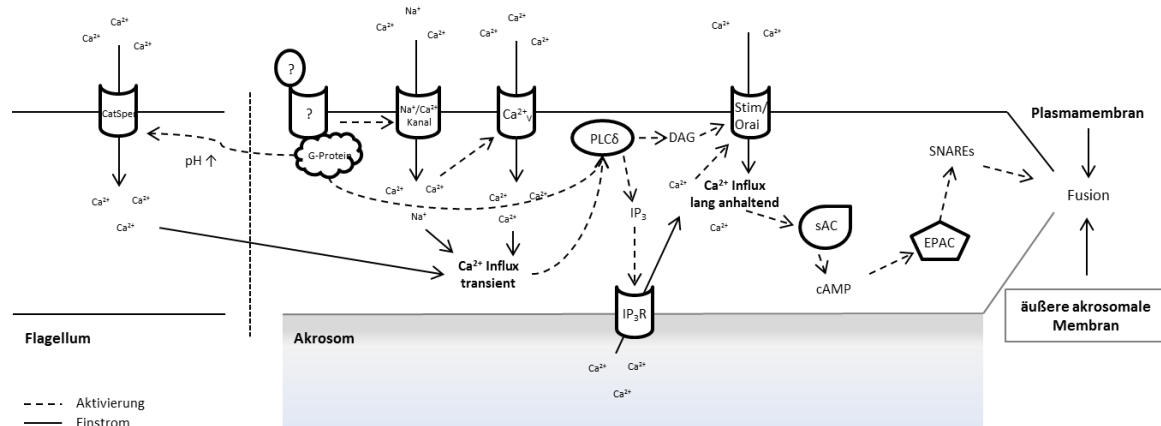


Abbildung 6: Signalkaskade der Akrosomreaktion. Die Bindung der *Zona pellucida* oder des Eihügels (*cumulus oophorus*) an einen bislang unbekannten GPCR in der Plasmamembran des Spermiums löst zwei Ca^{2+} -Wellen aus: Der erste, kurze Ca^{2+} -Einstrom wird durch die Aktivierung eines unspezifischen Kationen Kanals und der dadurch bedingten Aktivierung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle (Ca^{2+}_v) sowie durch eine parallele $\text{G}_{i/o}$ -Protein-vermittelte Alkalisierung der Zelle und der dadurch gesteuerten Stimulation des im Flagellum exprimierten pH-sensitiven CatSper-Kanals verursacht. Der zweite, langanhaltende Ca^{2+} -Einstrom wird durch die Aktivierung der Phospholipase und der dadurch resultierenden IP_3 -Akkumulation ausgelöst, da durch den IP_3R das Ca^{2+} aus dem lysosomalen Ca^{2+} -Speicher, dem Akrosom, austreten kann. Durch den zusätzlichen Influx von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum durch Stim/Orai-Kanäle wird die Konzentration der divalenten Ionen noch weiter erhöht, und bewirkt eine Stimulierung der SAC. Das Enzym spaltet ATP in cAMP, wodurch es mit Hilfe des Austauschfaktors EPAC und SNARE-Proteinen zur Fusion der Plasmamembran und der äußeren akrosomalen Membran kommt.

Hinsichtlich der sexuellen Reproduktion wird im ersten Teil dieser Einleitung durch das Vorstellen unterschiedlicher Forschungsergebnisse auf die Vielzahl wichtiger molekularer Abläufe (Kapazitierung, Wegfindung der Spermien, Akrosomreaktion) in den männlichen Keimzellen hingewiesen. Neben der Komplexität der einzelnen Ereignisse wird jedoch auch deutlich, dass gerade bei diesen Prozessen viele Mechanismen noch nicht exakt verstanden sind. Aus diesem Grund wird diese Thematik in der Grundlagenforschung weiterhin von großem Interesse sein.

1.2 Chemosensorische Sinneswahrnehmung

Per Definition ist ein Sinnesorgan ein Organ, „das der Aufnahme und Weiterleitung eines Sinnesreizes dient“. Je nachdem um welches Sinnesorgan es sich handelt, wird in den Sinneszellen ein empfangener Reiz in ein elektrisches Signal umgewandelt und über Nervenfasern an entsprechende Hirnareale weitergeleitet. Dort wird der sensorische Eindruck verarbeitet und eine Reaktion darauf ausgelöst.

Aus dem alltäglichen Sprachgebrauch sind die „fünf Sinne“ Sehen, Hören, Tasten, Riechen und Schmecken bekannt, von denen der Geruchs- und Geschmackssinn der chemosensorischen Sinneswahrnehmung zugeordnet werden. Hierbei werden von Sinneszellen chemische Stoffe (Liganden) erkannt und die dadurch ausgelöste elektrische Zellantwort an nachgeschaltete Zellen und das Gehirn weitergeleitet. Die Wahrnehmung gustatorischer und olfaktorischer Reize stellt für ein Lebewesen einen zentralen Mechanismus zur Registrierung von Informationen über das natürliche Umfeld dar und übt u. a. Einfluss auf das Nahrungs- und Sexualverhalten aus.

Nachfolgend werden sowohl die molekularen Grundlagen als auch die primären Signalweiterleitungen, die für das Empfinden beider chemosensorischer Reizarten verantwortlich sind, detailliert beschrieben.

1.2.1 Gustatorische Reizwahrnehmung

Die primäre Wahrnehmung von Geschmacksmolekülen findet in spezialisierten Zellen der Zunge, aber auch des Geschmacksstreifens des Gaumens, des Pharynx und des Larynx statt (Chandrashekar et al., 2006). Die Erkennung gustatorischer Reize auf der Zunge erfolgt durch Sinneszellen, die in drei unterschiedlichen Geschmackspapillen der Zunge vorkommen: die Pilzpapillen (*Papillae fungiformes*), die Blätterpapillen (*Papillae folliatae*) und die Wallpapille (*Papillae circumvallate*) (Abbildung 7). Die Pilzpapillen sind die am häufigsten auf der Zunge vorkommenden Papillen und erstrecken sich über das vorderste Drittel des Muskelorgans. Sie sind aus nur einer Geschmacksknospe mit den darin vorkommenden Geschmackszellen aufgebaut. Die Blätterpapillen hingegen befinden sich lateral im hinteren Bereich der Zunge und enthalten eine Vielzahl an Geschmacksknospen. Die größte Geschmackspapille ist die Wallpapille, die im proximalen Abschnitt der Zunge in der Mitte gelegen ist und die meisten Geschmacksknospen besitzt (Chaudhari and Roper, 2010; Hoon et al., 1999) (Abbildung 7). In Nagern ist diese nur einmal angelegt, wohingegen sich auf der menschlichen Zunge 7-9 Wallpapillen befinden.

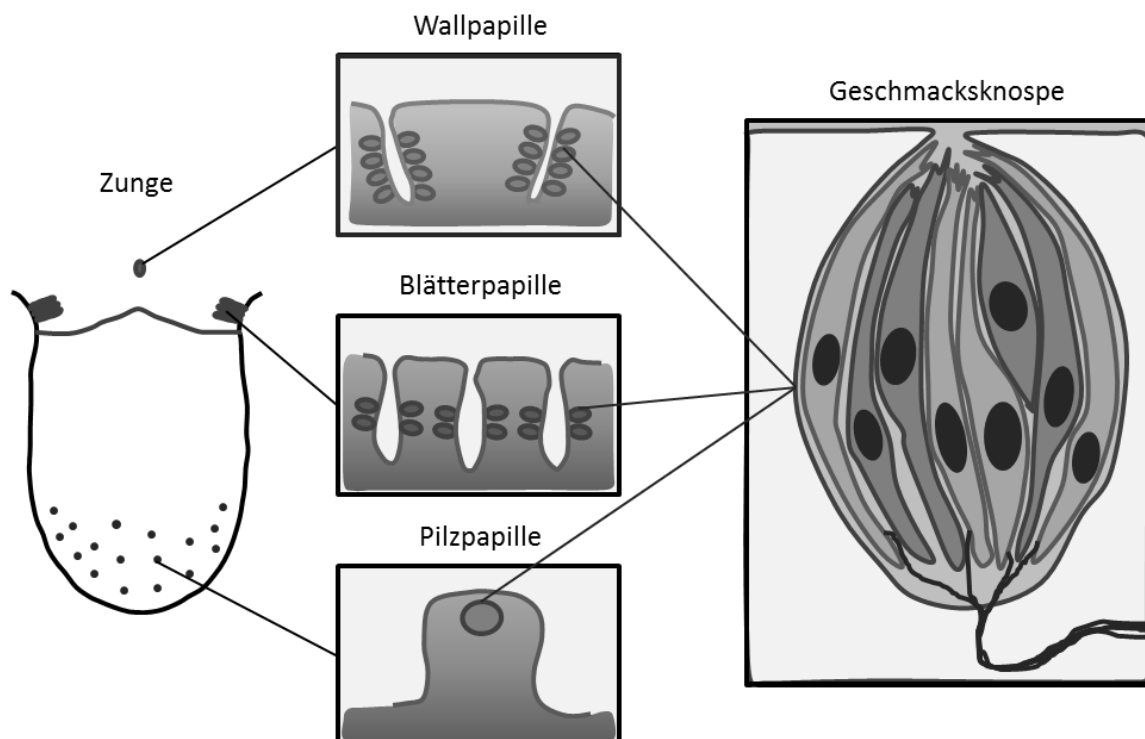


Abbildung 7: Geschmackspapillen auf der Zunge. Auf der Zunge gibt es drei verschiedene Geschmackspapillen: Pilzpapillen, Blätterpapillen und Wallpapillen. Während die am häufigsten vertretenen Pilzpapillen vorwiegend an der Zungenspitze vorkommen, befinden sich die Blätterpapillen und die Wallpapillen im hinteren Bereich der Zunge. In Geschmacksknospen der Papillen sind zahlreiche gustatorische Sinneszellen zusammengefasst, wobei die apikal lokalisierten Mikrovilli aus der Geschmackspore hinaus in die Mundhöhle ragen und so in Kontakt mit den Geschmacksstoffen kommen.

Geschmacksknospen sind kleine epitheliale, sensorische Organe, die eine Vielzahl an Geschmackszellen enthalten und mit afferenten Nervenfasern verschaltet sind (Abbildung 7). In der zwiebförmigen Struktur der Geschmacksknospe sind einige spindelförmige Sinneszellen so angeordnet, dass deren Mikrovilli am apikalen Ende der Geschmacksknospe durch die Geschmackspore hindurch in die Mundhöhle ragen und dort mit den Geschmacksstoffen in Kontakt kommen. Es kann zwischen vier funktionell andersartigen Zelltypen innerhalb einer Geschmacksknospe unterschieden werden, die in der Literatur als Typ I-, II-, III- und IV-Zellen bezeichnet werden. Die Typ I-Zellen oder auch Glia-ähnlichen Zellen umgeben stützend die Typ II- und Typ III-Zellen. Die größeren, spindelförmigen Typ II-Zellen werden auch als Rezeptorzellen bezeichnet, da sie die Geschmacksrezeptorproteine und Signalproteine zur Detektion und Weiterleitung unterschiedlicher Geschmacksqualitäten exprimieren. Mit ihren Mikrovilli gesäumten apikalen Enden erstrecken sie sich durch die Geschmackspore in die Mundhöhle. Dort gelangen die in der Plasmamembran der Typ II-Zellen befindlichen Geschmacksrezeptoren mit den im Speichel gelösten Geschmacksstoffen in Kontakt. Nachweislich bilden die Rezeptorzellen keine synaptische Verbindung mit afferenten Nervenfasern aus, sondern leiten das Rezeptorpotential durch die Freisetzung von ATP an die benachbarten Typ III-Zellen weiter. Die innervierten Typ III-Zellen exprimieren synaptische Proteine (z. B. SNAP-25) und sind dadurch in der Lage, das empfangene Signal auf Nervenfasern zu übertragen, weshalb sie auch als präsynaptische Zellen bezeichnet werden. Bei dem vierten Zelltyp der Geschmackszellen handelt es sich um Basalzellen bzw. gustatorische Stammzellen, aus denen sich regelmäßig neue Geschmackszellen bilden (Chandrashekar et al., 2006; Chaudhari and Roper, 2010; Huang et al., 2009; Suzuki, 2007).

1.2.1.1 Geschmacksmodalitäten

Der Sinneseindruck eines Geschmacks in einem Nahrungsmittel setzt sich aus Information über dessen Geschmacks und Geruch aber auch dessen Textur und Temperatur zusammen. Mit Hilfe der chemosensorischen Proteine in den Geschmackszellen ist es lediglich möglich, die fünf Geschmacksmodalitäten Süß, Sauer, Salzig, Bitter und Umami (herzhaft, köstlich) wahrzunehmen und zu unterscheiden. Gegenwärtig wird aber auch diskutiert, dass Lipide eine sechste Geschmacksmodalität darstellen könnten (Besnard et al., 2016; Chaudhari and Roper, 2010).

Die fünf grundlegenden Geschmacksqualitäten können unterschiedliche hedonistische Bewertungen in einem Lebewesen auslösen. Während Zucker und seine Derivate mit dem positiven Empfinden des süßen Geschmacks verknüpft sind (Behrens et al., 2011) und die Modalität Umami (japanisch: köstlich), bei der u. a. Mononatriumglutamat (MNG) oder L-Aspartat wahrgenommen wird, meist den Wunsch nach „mehr“ auslöst (Nelson et al., 2002), rufen die Geschmacksrichtungen Sauer (ausgelöst durch Protonen) (Huang et al., 2006; Ishimaru et al., 2006) und Salzig (Detektion von Natriumchlorid) (Heck et al., 1984) hauptsächlich aversive Emotionen hervor. Derart ablehnende Reaktionen von stark sauer und salzig schmeckenden Lebensmitteln fungieren als Schutzmechanismus, um die Aufnahme unreifer oder verdorbener Nahrung zu verhindern. Die Geschmacksqualität Bitter löst ebenfalls Abwehrreaktionen aus, um giftige, meist bitter schmeckende Substanzen nicht zu verschlucken. In geringen Konzentrationen werden einige bittere Geschmacksstoffe jedoch auch als wohlschmeckend empfunden (z. B. Kaffee, Zartbitterschokolade) (Mombaerts, 2004; Roper and Chaudhari, 2009).

Auch auf Ebene der proteinbiochemischen Wahrnehmung unterscheiden sich die fünf Geschmacksmodalitäten: Während salzige und saure Reize über die Ionenkanäle ENaC (engl.: *epithelial Na⁺ channel*) bzw. PKD2L1 (engl.: *polycystic kidney disease 2-like 1 protein*) detektiert werden (Heck et al., 1984; Huang et al., 2006; Ishimaru et al., 2006), werden süße, bittere und umami Signale durch metabotrope Rezeptoren (GPCRs) in der Plasmamembran der Rezeptorzellen erkannt (Mombaerts, 1999). Im Folgenden wird ausschließlich die molekulare Abfolge der komplexen gustatorischen Reizdetektion und Reizweiterleitung der durch GPCR-vermittelten Geschmacksrichtungen vorgestellt.

1.2.1.2 Geschmacksrezeptoren

Heptahelikale metabotrope Rezeptoren durchspannen die Plasmamembran einer Zelle. Die N-terminale Aminosäuresequenz (C-H₂N-Gruppe) ragt dabei in den Extrazellularraum und kann als Ligandenbindestelle fungieren, wohingegen der C-Terminus (C-COOH-Gruppe) in den Intrazellularraum reicht und dort ein heterotrimeres G-Protein direkt aktiviert. Bei dieser Aktivierung handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, der durch die extrazelluläre Bindung eines Agonisten an den Rezeptor ausgelöst wird. Dabei ändert sich die Konformation des Rezeptors, wodurch an der α -Untereinheit des G-Proteins ein Austausch von GDP (Guanosindiphosphat) und GTP (Guanosintriphosphat) stattfindet und infolgedessen das G-Protein in die α - und die $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziiert. Mit Hilfe der Untereinheiten kann nun eine, durch das extrazelluläre Signal ausgelöste, Signaltransduktion im Zellinneren erfolgen (Lefkowitz, 2013).

Unter den gustatorischen GPCRs wird zwischen zwei verschiedenen Geschmacksrezeptorfamilien unterschieden: den Rezeptoren der Tas1-Familie und den Rezeptoren der Tas2-Familie (Montmayeur and Matsunami, 2002). Die Tas1-Rezeptorfamilie (Tas1R) besteht aus drei Mitgliedern, Tas1r1, Tas1r2, Tas1r3, die untereinander heterodimere Komplexe formen können, um so als Süß- (Tas1r2 + Tas1r3) bzw. Umami-Rezeptor (Tas1r1 + Tas1r3) zu funktionieren. Durch die Dimerisierung können die zu der Klasse C gehörenden GPCRs der Tas1R-Familie über ihre große extrazelluläre Einheit eine sogenannte *venus flytrap* Struktur bilden, mit der sie in der Lage sind, Liganden, wie z. B. Zuckermoleküle oder Peptide, zu binden (Li et al., 2002; Max et al., 2001; Pin et al., 2004) (Abbildung 8). Allerdings kann eine Ligandenbindung auch durch die Membrandomänen erfolgen (Cui et al., 2006; Masuda et al., 2012; Temussi, 2009). Während Tas1r2-Tas1r3 Rezeptoren unter anderem Sucrose, Fructose, künstliche Süßstoffe sowie Kohlenhydrate erkennen, können Rezeptordimere aus Tas1r1 und Tas1r3 beispielsweise die Aminosäuren Glutamin und Asparagin detektieren und dadurch den Umami-Geschmack vermitteln (Li et al., 2002; Nelson et al., 2002). Geschmackspräferenztests an gentechnisch veränderten Mäusen haben gezeigt, dass Nager bei denen einzelne Tas1Rs deletiert sind, zwar immer noch die Fähigkeit besitzen, die entsprechenden Geschmäcker wahrzunehmen, allerdings nur, wenn diese in hohen Konzentrationen vorliegen. Eine gleichzeitige genetische Deletion von Tas1r1-Tas1r2- bzw. Tas1r1-Tas1r3 führt hingegen zu einem drastischen Wahrnehmungsverlust der Geschmacksmodalitäten Süß bzw. Umami (Chandrashekar et al., 2006). Zusätzliche Studien haben gezeigt, dass der Tas1r3-Rezeptor funktionelle Homodimere bilden kann (Zhao et al., 2003) und dadurch das elementare funktionelle Mitglied dieser Rezeptorfamilie repräsentiert, da er, unabhängig von seinen

Dimerisierungspartnern, einen sensorischen Reiz erkennen und dadurch die gustatorische Signalkaskade auslösen kann.

Durch ihren langen, extrazellulären N-Terminus unterscheiden sich die Tas1R strukturell von den Klasse A GPCRs der Tas2-Familie. Diese haben ein kurzes N-terminales, extrazelluläres Ende und binden gelöste Bitterstoffe innerhalb der Membrandomänen (Floriano et al., 2006) (Abbildung 8). In Mäusen umfasst die Familie der Bitterrezeptoren ca. 30 Mitglieder und stellt die größte Geschmacksrezeptorfamilie in der Ordnung der Nagetiere dar (im humanen System sind 25 Tas2-Rezeptoren bekannt) (Adler et al., 2000; Behrens et al., 2007; Chandrashekar et al., 2000; Meyerhof et al., 2011).

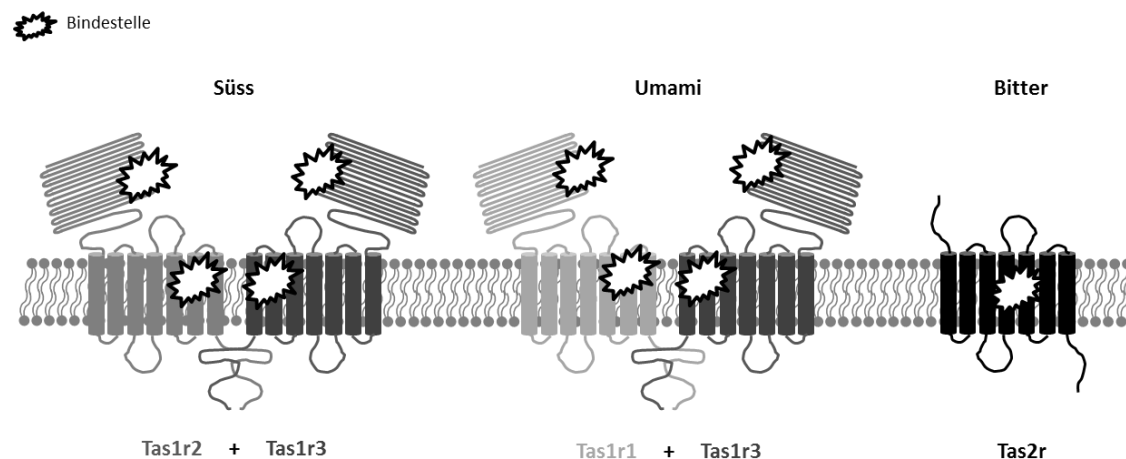


Abbildung 8: Geschmacksrezeptoren. Die Wahrnehmung der Geschmäcker Süß, Umami und Bitter erfolgt über GPCRs der Familie Tas1R und Tas2R in den Geschmackszellen der Zunge. Die drei Mitglieder der Tas1R-Familie formen durch Heterodimerisierung die funktionellen Geschmacksrezeptoren für den Süß- (Tas1r2+Tas1r3) und Umami-Geschmack (Tas1r1+Tas1r3). Sie sind in der Lage, Liganden über eine extrazelluläre *venus flytrap* Struktur oder Sequenzen innerhalb der Transmembrandomänen zu binden. Die Detektion von bitteren Geschmacksstoffen erfolgt durch Vertreter der Tas2R-Familie von Geschmacksrezeptoren, die bei Nagern ca. 30 Mitglieder umfasst. Im Gegensatz zu den Tas1Rs erfolgt hier die Ligandenbindung ausschließlich durch die Transmembrandomänen (Modifiziert nach Yarmolinsky et al., 2009).

1.2.1.3 Gustatorische Signalweiterleitung

Die Detektion eines Geschmacksmoleküls findet in den Typ II-Zellen der Geschmacksknospen statt. Dort bindet der Ligand an den GPCR, wodurch die Aktivierung eines intrazellulären trimären G-Proteins erfolgt. Dieses G-Protein dissoziiert nach Aktivierung in die α -Gustducin- und die β_3/γ_{13} -Untereinheit (Huang et al., 2003; McLaughlin et al., 1992), wobei die β_3/γ_{13} -Untereinheit die PLC β 2 aktiviert (Rossler et al., 1998) und diese dann Phosphoinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) in die Produkte Diacylglycerol (DAG) und IP $_3$ spaltet. Der *second messenger* IP $_3$ bindet an den IP $_3$ -gesteuerten Rezeptor des Subtyps 3, der in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Dieser intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Speicher leert sich durch die Aktivierung des IP $_3$ R, wodurch sich die zytoplasmatische Ca $^{2+}$ -Konzentration erhöht (Clapp et al., 2001; Roper, 2007). Mehreren Studien zufolge wird durch diesen Prozess der Ca $^{2+}$ -aktivierte Kationenkanal der TRP-Ionenkanal Melastatin Unterfamilie, TRPM5, aktiviert, wodurch es zu einem Einstrom von monovalenten Ionen (u. a. Na $^+$) kommt (Hofmann et al., 2003; Liu and Liman, 2003; Perez et al., 2002). Durch den Influx von positiv geladenen Ionen und der Erhöhung

der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird die Zelle depolarisiert, und der Neurotransmitter ATP durch den Pannexin-1 Kanal ausgeschüttet (Huang et al., 2007; Romanov et al., 2007). Seit kurzem wird auch der CALHM1-Kanal als möglicher Kandidat für den ATP-Efflux aus den Typ II-Zellen diskutiert (Kinnamon and Finger, 2013; Taruno et al., 2013). Der freigesetzte Botenstoff ATP kann von P2X/P2Y-Rezeptoren auf den innervierten Typ III-Geschmackszellen erkannt werden, die anschließend das Signal auf afferente Nervenfasern übertragen. Auf diese Weise kann das weitergeleitete Signal in den gustatorischen Cortex des Gehirns projiziert werden und eine Geschmacksempfindung stattfinden (Huang et al., 2009; Huang et al., 2007) (Abbildung 9).

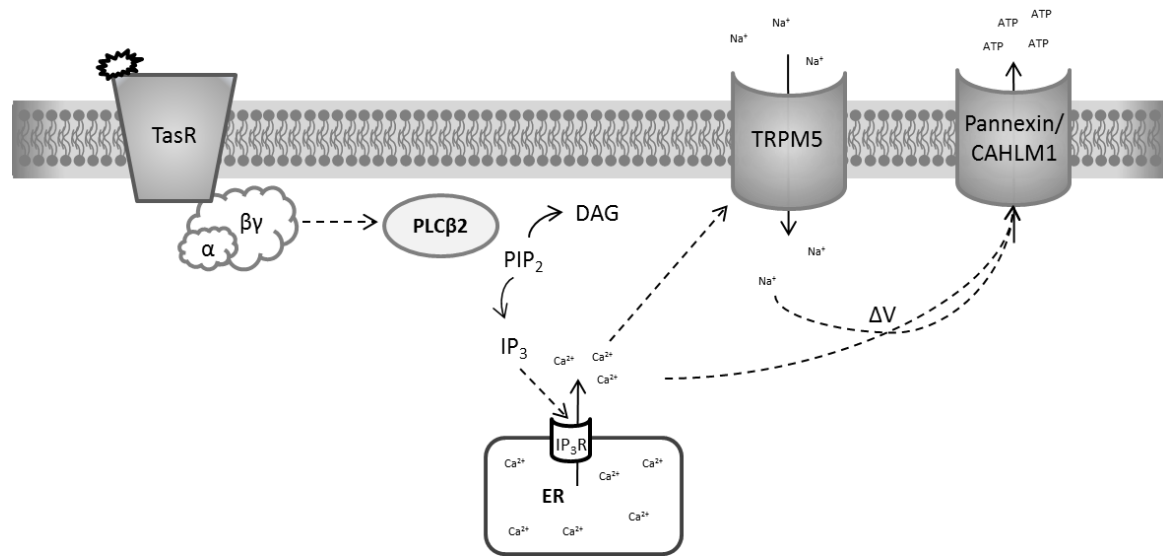


Abbildung 9: Gustatorische Signalkaskade. Durch die Bindung eines Liganden an einen Geschmacksrezeptor (TasR) wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst. Sie beginnt mit der Induktion eines an den Rezeptor gebundenen G-Proteins, dessen $\beta\gamma$ -Untereinheit die PLC β 2 aktiviert, und dadurch PIP $_2$ katalytisch in DAG und IP $_3$ gespalten wird. Der *second messenger* IP $_3$ bindet an einen IP $_3$ R in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER), wodurch der intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher Ca^{2+} in das Zytosol entlässt. Durch die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle wird der TRPM5-Ionenkanal aktiviert, und monovalente Kationen strömen in die Zelle ein, so dass die Depolarisation verstärkt wird. Durch die darauffolgende Öffnung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle (Pannexin, CAHLM1) wird der Neurotransmitter ATP ausgeschüttet, durch den die Weiterleitung des Signals an die präsynaptischen Typ III-Zellen und anschließend an den gustatorischen Cortex des Gehirns erfolgt.

Nach der Bindung eines Liganden an einen gustatorischen GPCR dissoziiert das gebundene G-Protein in die β_3/γ_{13} -Untereinheit und die α -Gustducin-Untereinheit. In α -Gustducin-*knockout*-Mäusen wurde eine verminderte Perzeption der GPCR-vermittelten Geschmacksmodalitäten Süß, Umami und Bitter festgestellt (Behrens and Meyerhof, 2006; Caicedo et al., 2003; Chandrashekar et al., 2006; Wong et al., 1996). Daraus ergeben sich zwei Überlegungen: Entweder erfolgt der Hauptweg, der gustatorischen Signalkaskade, über die β_3/γ_{13} -Untereinheit-vermittelte Signaltransduktion (Abbildung 9), weswegen die Geschmackswahrnehmung in α -Gustducin-*knockout*-Mäusen nur reduziert, aber nicht vollständig ausgeschaltet ist; oder aber die abgeschwächte Geschmackswahrnehmung aufgrund der Deletion von α -Gustducin erfolgt durch eine kompensatorische Aktivität von Transducin, einem weiteren G-Protein, das in Geschmackszellen exprimiert wird (McLaughlin et al., 1993). Zusätzlich zur reduzierten Geschmackswahrnehmung wurde in α -Gustducin-*knockout*-Mäusen eine erhöhte cAMP-Konzentration festgestellt (Clapp et al., 2008). Trotz zahlreicher Überlegungen zur funktionellen

Rolle der α -Gustducin-Untereinheit, wie z. B. ihr Einfluss auf die Sensitivität der Zelle (Clapp et al., 2008; Liu and Simon, 1996) oder deren direkte Aktivierung durch einen bitteren Geschmacksstimulus (Caicedo et al., 2003; Margolskee, 2002; Yan et al., 2001), konnte dem α -Gustducin bislang keine eindeutige chemosensorische Funktion zugeordnet werden.

1.2.2 Olfaktorische Reizwahrnehmung

Zusammen mit dem Geschmackssinn bildet der Geruchssinn den chemischen Sinn. Denn bei der olfaktorischen Wahrnehmung können auch chemische Substanzen, wie Geruchsmoleküle und Pheromone, detektiert werden. Durch diese olfaktorische Perzeption sind wichtige Prozesse, wie die Wahrnehmung und Bewertung des Umfelds und der Nahrung, sowie die innerartliche Kommunikation möglich (Hayden and Teeling, 2014; Munger et al., 2009). Das olfaktorische Epithel in der Nasenhöhle (engl.: *main olfactory epithelium*; MOE) und das Vomeronasalorgan (VNO) sind die Hauptorgane für die olfaktorische Wahrnehmung, wobei die Existenz eines funktionellen VNOs beim Menschen umstritten ist (Rodriguez and Mombaerts, 2002; Trotier, 2011; Witt and Hummel, 2006). Neben diesen beiden Organsystemen entwickelten Nager zusätzliche olfaktorische Organe, wie das Septalorgan von Masera (SP) und das Grüneberg Ganglion (GG), in denen ebenfalls chemosensorische Neurone für die Geruchswahrnehmung beschrieben wurden (Fleischer and Breer, 2010; Hayden and Teeling, 2014; Keller and Vosshall, 2008; Liu et al., 2009) (Abbildung 10).

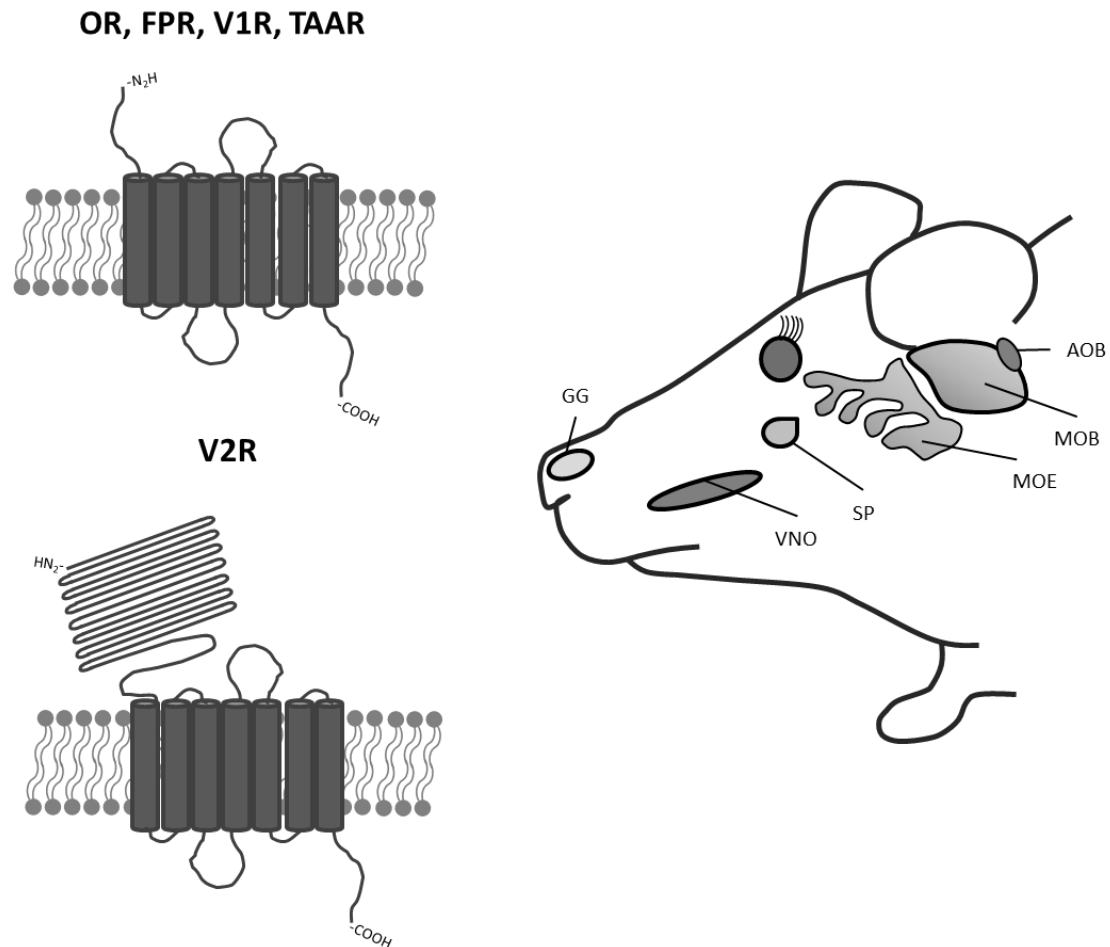


Abbildung 10: Olfaktorische Organe und Rezeptoren. Alle olfaktorischen Rezeptoren, ORs, FPRs, V1Rs, V2Rs, TAARs sind GPCRs mit sieben Transmembrandomänen, deren N-Terminus auf der extrazellulären Seite lokalisiert ist, während der C-Terminus in den Intrazellularraum ragt. Abweichend von allen anderen Geruchsrezeptoren verfügen nur V2R-Rezeptoren über einen langen N-Terminus. In der schematischen Zeichnung einer Maus sind alle olfaktorischen Organe und ihr Situs eingezeichnet: olfaktorisches Epithel (MOE), Vomeronasalorgan (VNO), Septalorgan nach Masera (SP) und Grüneberg Ganglion (GG). Außerdem sind die Hirnareale, in die der Sinnesreiz projiziert wird (olfaktorischer Bulbus (MOB) und akzessorischer olfaktorischer Bulbus (AOB)), gezeigt (Modifiziert nach (Spehr and Schué, 2010)).

1.2.2.1 Geruchsmoleküle und -rezeptoren

Die Wahrnehmung von Gerüchen beginnt mit Rezeptoren, die in bipolaren olfaktorischen Sinnesneuronen exprimiert werden. Auf der apikalen Seite ragen Rezeptor-besetzte ziliäre Fortsätze in das Lumen der Nasenhöhle, um Geruchsmoleküle zu binden, wohingegen auf der basalen Seite der Sinneszelle ein Axon entspringt, das die empfangene Information in den olfaktorischen Bulbus im Gehirn projiziert.

In geruchswahrnehmenden Organen gibt es mindestens einen der drei unterschiedlichen Typen von chemosensorischen Rezeptoren: olfaktorische Rezeptoren (ORs), vomeronasal Rezeptoren (VRs) und „*trace amine-associated receptors*“ (TAARs) (Buck and Axel, 1991; Dewan et al., 2013; Hayden and Teeling, 2014; Keller and Vosshall, 2008; Munger et al., 2009) (Abbildung 10). In der Ordnung der Nagetiere sind die olfaktorischen Rezeptoren der Klasse A GPCRs, mit über 1200 Genen, die größte Gruppe (Buck and Axel, 1991; Mombaerts, 2004). Sie werden hauptsächlich in Sinnesneuronen des olfaktorischen Epithels (Fleischer et al., 2009), vereinzelt jedoch auch im VNO (Levai et al., 2006) und SP (Kaluza et al., 2004), exprimiert, wo sie direkt mit

Geruchsmolekülen in Kontakt kommen und eine spezifische Signalkaskade auslösen. Phylogenetische Analysen ergaben, dass olfaktorische Rezeptoren in die Klasse I- und Klasse II Rezeptoren eingeteilt werden können. Die Mitglieder der kleineren Klasse I Rezeptorgruppe fungieren als molekulare Detektoren für wasserlösliche Odorantien (Freitag et al., 1998), wohingegen die weitaus größere Gruppe der Klasse II Rezeptoren hydrophobe oder volatile Bestandteile der Luft registrieren kann (Hayden and Teeling, 2014). Die Bindung eines Geruchsmoleküls findet nicht an dem kurzen, extrazellulären N-Terminus des Rezeptors statt, sondern direkt in den Transmembrandomänen des GPCRs. Aufgrund der hohen Sequenzvariabilität, die innerhalb der Transmembrandomänen herrscht, unterscheiden sich die ORs voneinander, so dass viele verschiedene Odorantien erkannt und unterschieden werden können (Buck and Axel, 1991; Fleischer et al., 2009; Krautwurst et al., 1998).

Die zweite Gruppe der Geruchsrezeptoren umfasst die VRs, die für die Wahrnehmung von Pheromonen zur innerartlichen Kommunikation wichtig sind. Die im VNO exprimierten VRs können in die beiden Unterfamilien der V1Rs und V2Rs eingeteilt werden, (Ma, 2007; Munger et al., 2009), wobei in der letzten Dekade eine weitere Gruppe der VRs identifiziert werden konnte: die Formyl-Peptid Rezeptoren (FPRs). Diese Gruppe von Rezeptoren wird im VNO exprimiert und kann formylierte Peptide detektieren, die von Bakterien während eines Entzündungsprozesses ausgeschieden wurden, und dadurch Einfluss auf die Immunantwort nehmen (Liberles et al., 2009; Riviere et al., 2009). Die VR-Unterfamilien V1R und V2R werden in unterschiedlichen Arealen des vomeronasalen Epithels exprimiert und unterscheiden sich unter anderem in ihrer Struktur und ihren Liganden: Während die strukturell den ORs ähnlichen GPCRs der V1-Rezeptorfamilie im apikalen Neuroepithel des VNOs lokalisiert sind und kleine volatile Moleküle binden, werden die V2Rs hauptsächlich in der basalen Epithelschicht des VNOs exprimiert und erkennen größere, wasserlösliche Peptide (Buck, 2000; Dulac and Axel, 1995; Mombaerts, 2004; Munger et al., 2009; Yang et al., 2005). Strukturell können die V2Rs in die Klasse C der GPCRs eingeordnet werden, deren charakteristisches Merkmal ein langer, extrazellulärer N-Terminus ist (Matsunami and Buck, 1997; Ryba and Tirindelli, 1997). Im dimerisierten Zustand des Rezeptors kann mit dieser langen Aminosäuresequenz eine *venus flytrap* Struktur gebildet werden, mit der die strukturell verwandten Geschmacksrezeptoren der Tas1-Familie Liganden binden können. Ob dieser Mechanismus auch durch die V2Rs genutzt wird, ist bis *dato* ungeklärt (Fleischer et al., 2009; Francia et al., 2014; Touhara and Vosshall, 2009; Yang et al., 2005) (Abbildung 10).

Eine weitere Gruppe der Geruchsrezeptoren stellen die bisher in geringer Anzahl identifizierten TAARs der Klasse A GPCRs dar, die hauptsächlich im OE exprimiert werden (Fleischer et al., 2007; Hashiguchi and Nishida, 2007). Sie werden vorwiegend durch Amine, die im Urin enthalten sind, aktiviert, wodurch sie vermutlich an der Wahrnehmung sozialer und/oder alarmierender Gerüche beteiligt sind (Borowsky et al., 2001; Hayden and Teeling, 2014; Liberles et al., 2009).

1.2.2.2 Olfaktorische Signalweiterleitung im olfaktorischen Epithel

Der Geruchsreiz, der von den olfaktorischen Rezeptoren erkannt wird, wird in den olfaktorischen Sinnesneuronen in ein elektrisches Signal umgewandelt (Buck, 1996). Durch die Bindung eines Liganden an einen G-Protein-gekoppelten Odorantrezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und daraus resultierend zur Aktivierung eines intrazellulär gebundenen G-Proteins, das G_{olf} (Touhara and Vosshall, 2009). Das aktivierte G-Protein stimuliert anschließend eine membranständige Adenylatzyklase (mAC) III, die die

enzymatische Umsetzung von ATP in cAMP katalysiert (Sklar et al., 1986; Wong et al., 2000). Durch die intrazelluläre Konzentrationserhöhung von cyclischen Nukleotiden können cAMP-regulierte Kationenkanäle geöffnet werden, die zu einem Influx von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen und damit zu einer Depolarisation der chemosensorischen Zelle führen (Brunet et al., 1996). Um die Depolarisation der Zelle zu verstärken werden Ca^{2+} -gesteuerte Chlorid (Cl^-) Kanäle geöffnet, wodurch Cl^- -Ionen, entsprechend ihrem elektrochemischen Gradienten in Sinneszellen, aus der Zelle heraus diffundieren (Reisert et al., 2003; Reuter et al., 1998). Das aus dem Rezeptorpotential resultierende Aktionspotential wird anschließend über Axone der olfaktorischen Sinnesneurone in den olfaktorischen Bulbus und schließlich in den olfaktorischen Cortex des Gehirns übermittelt, wo eine Decodierung des Signals stattfindet (Firestein, 2001; Mombaerts, 2004; Zufall and Munger, 2001) (Abbildung 11).

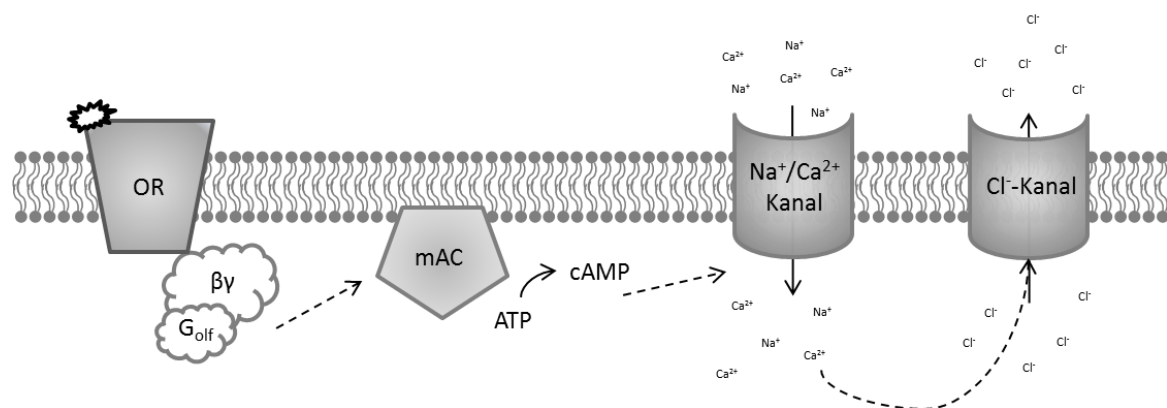


Abbildung 11: OR-vermittelte Signalweiterleitung in olfaktorischen Sinnesneuronen. Die Bindung eines Duftmoleküls an einen Odorantrezeptor (OR) löst eine G_{olf}-Protein-aktivierte Stimulierung einer membrangebundenen Adenylatzyklase III (mAC) aus. Daraus resultierend wird ATP durch das Enzym katalytisch zu cAMP abgebaut und der intrazelluläre Konzentrationsspiegel von cyclischen Nukleotiden erhöht. Dadurch werden in der Membran lokalisierte cAMP-gesteuerte Na⁺/Ca²⁺-Kanäle aktiviert, die einen Influx mono- und divalenter Kationen in die Zelle erlauben und so die Zelle depolarisieren. Die intrazellulären Ca²⁺-Ionen aktivieren anschließend Cl⁻-leitende Kanäle, aus denen Cl⁻-Ionen aus der Zelle hinausströmen können, wodurch die Zelldepolarisation verstärkt wird.

1.2.3 Ektope Expression von chemosensorischen Proteinen

In der letzten Dekade kam es im Forschungsfeld der Chemosensorik zu einem Paradigmenwechsel aufgrund zahlreicher veröffentlichter Beispiele ektoper Expressionen von chemosensorischen Signalproteinen. Die Translation von Genen gustatorischer und olfaktorischer Signalproteine außerhalb der primären Sinnesorgane deutet darauf hin, dass diesen Proteinen eine weitreichendere Funktion zukommt, als die bisher angenommene bloße Reizwahrnehmung durch die Zunge und die Nase. Während die Funktion der chemosensorischen Proteine lange Zeit ausschließlich im nasalen und oralen System untersucht wurde, entwickelte sich daher in den letzten Jahren ein stetig wachsendes Forschungsgebiet, das sich mit der Frage beschäftigt, welche Rolle ektopisch exprimierte chemosensorische Proteine übernehmen.

1.2.3.1 Extraorale Expression von gustatorischen Proteinen

Für die Expression von Geschmacksrezeptoren, α-Gustducin, TRPM5 und vielen weiteren Proteinen des oralen chemosensorischen Signalwegs wurde lange Zeit der Fokus ausschließlich

auf die Geschmackszellen der Zunge gelegt. Inzwischen wird aber immer häufiger die Expression von gustatorischen Proteinen in einzelnen Zellen von Organen außerhalb der Mundhöhle, wie dem Gastrointestinaltrakt (Bezencon et al., 2008; Rozengurt and Sternini, 2007; Sternini et al., 2008), den Atemwegen (Deshpande et al., 2010; Kinnamon and Reynolds, 2009; Tizzano et al., 2011) und dem männlichen- (Fehr et al., 2007; Li, 2013; Li and Zhou, 2012; Meyer et al., 2012; Mosinger et al., 2013; Voigt et al., 2012) und weiblichen Reproduktionsorganen (Wolfle et al., 2016) belegt.

Im murinen Magen wurden Geschmacksrezeptoren der Tas1-Familie vereinzelt in enteroendokrinen Zellen beschrieben (Sternini et al., 2008), die als Folge der Ligandenbindung das Appetit-anregende Hormon Ghrelin ausschütten und dadurch die Nahrungsaufnahme fördern (Hass et al., 2007; Hass et al., 2010). In der aktuellen Forschung ist diese Form der ektopen Expression von Geschmacksrezeptoren besonders interessant für die Entwicklung geeigneter Therapieansätze bei Adipositas-Patienten (Laffitte et al., 2014). Zusätzlich gibt es Belege für die Expression von Tas1R in den Betazellen des Pankreas und der damit verbundenen Tas1R-abhängigen Regulierung der Insulin-Freisetzung (Henquin, 2012; Laffitte et al., 2014).

Neben den Tas1R konnten im Magen-Darm-Trakt auch die Rezeptoren der Tas2R-Familie nachgewiesen werden, die dort eine Schutzfunktion ausüben, indem sie in Nagern die Magenentleerung verzögern, um die Aufnahme weiterer toxischer Nahrung, die meist bitter schmeckt, zu verhindern (Glendinning et al., 2008; Prandi et al., 2013). Sind toxische Substanzen in den Dickdarm gelangt, können diese von intestinal exprimierten Tas2Rs detektiert werden. Durch die Bindung der extraoral exprimierten Tas2Rs wird eine endokrin-regulierte Anionen-Ausschüttung initiiert, so dass Flüssigkeit sezerniert wird, und schädliche Substanzen aus dem Darm ausgespült werden können (Finger and Kinnamon, 2011; Kaji et al., 2009).

Eine große Anzahl an verschiedenen gustatorischen Signalproteinen konnte auch in den Atemwegen nachgewiesen werden (Finger et al., 2003; Kaske et al., 2007; Zancanaro et al., 1999). Dort detektieren chemosensorische Proteine, die in einzelnen respiratorischen Epithelzellen der unteren Atemwege exprimiert werden, schädliche Substanzen (z. B. Nikotin), woraufhin die Frequenz der Zilienschläge des pulmonalen Flimmerepithels zunimmt, und die inhalede, toxische Substanz schnell abtransportiert werden kann (Shah et al., 2009). Das Einatmen reizender Substanzen kann jedoch auch von Tas2R-exprimierenden Zellen in den oberen Atemwegen wahrgenommen werden, die neuronal mit dem Trigeminalganglion verschaltet sind und dadurch reflexartige Schutzreaktionen wie Husten oder Niesen auslösen (Finger et al., 2003; Tizzano et al., 2011; Tizzano et al., 2010).

Zusätzlich zum Gastrointestinaltrakt, dem Pankreas und den unteren und oberen Atemwegen konnte auch in humanem Plazentagewebe ein Bitterrezeptor (Tas2r38) nachgewiesen werden. Ähnlich der möglichen endokrinen Funktion von Tas2Rs im Verdauungstrakt, wird für den Tas2r38 in der Plazenta eine chemosensorische Rolle zur hormonellen Sekretionsregulation postuliert (Wolfle et al., 2016).

Auch im männlichen Reproduktionssystem konnten Proteine der Geschmackssignalkaskade identifiziert werden. RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) Studien und immunhistochemische Analysen belegen hierbei die Expression von verschiedenen Geschmacksrezeptoren und nachgeschalteten Signalproteinen sowohl in einzelnen Zellen des testikulären Gewebes als auch in Spermien (Fehr et al., 2007; Li and Zhou, 2012; Meyer et al., 2012; Mosinger et al., 2013; Voigt et al., 2015; Voigt et al., 2012; Xu et al., 2013). Um die genaue Expression und die Funktion dieser gustatorischen Proteine im männlichen

Reproduktionsgewebe näher untersuchen zu können, wurden einige Mausmodelle generiert, die es erlauben die Proteinexpression, den Zuchterfolg sowie die Spermatogenese in Abhängigkeit eines Geschmacksproteins zu untersuchen. Aus allen veröffentlichten Arbeiten geht hervor, dass sowohl die nachgeschalteten Signalproteine α -Gustducin (Fehr et al., 2007), PLC β 2 und TRPM5 (Li, 2013; Li and Zhou, 2012), als auch die Geschmacksrezeptoren Tas1r1 (Meyer et al., 2012), Tas1r2 (Iwatsuki et al., 2010; Mosinger et al., 2013), Tas1r3 (Meyer et al., 2012; Mosinger et al., 2013), Tas2r5 (Li and Zhou, 2012), Tas2r105, Tas2r108 (Xu et al., 2013) und Tas2r131 (Meyer et al., 2012; Voigt et al., 2012) in den späten Phasen der Spermatogenese in den *Tubuli seminiferi* exprimiert werden.

Trotz dieser initialen Befunde zur ektopen Expression von Geschmacksproteinen im männlichen Reproduktionstrakt, gibt es nur wenige Studien über deren tatsächliche Funktion hinsichtlich der Fertilität. Über das α -Gustducin ist zwar bekannt, dass es im Flagellum eines Spermiums und im Akrosom exprimiert wird, jedoch ließ sich im α -Gustducin-*knockout* Mausmodell keinerlei reproduktive Beeinträchtigung der beobachteten Tiere erkennen (Fehr et al., 2007; Mosinger et al., 2013). Als einziges gustatorisches Signalprotein wurde der monovalente Kationenkanal TRPM5 nicht nur in den Hodentubuli nachgewiesen, sondern auch in den Testosteron-sekretierenden Leydig Zellen im Interstitialraum (Li, 2013). Dies könnte erstmals ein Hinweis auf eine Beteiligung gustatorischer Signalproteine an der endokrinen Regulierung der Reproduktion sein. Im Rahmen einer Studie zu Körpergewicht und dem Glukosehaushalt in TRPM5-defizienten Mäusen, wurden jedoch keine drastischen Fruchtbarkeitseinschränkungen erwähnt (Larsson et al., 2015), so dass davon auszugehen ist, dass eine TRPM5-Deletion alleine keine schwerwiegende Dysfunktion auslöst, die Einfluss auf den reproduktiven Erfolg hat. Weiterhin zeigten auch *knockout*-Mausmodelle des Tas1r1 und Tas1r3 keinen stark ausgeprägten Reproduktions-Phänotyp (Meyer et al., 2012; Mosinger et al., 2013), so dass eine funktionell essentielle Rolle eines der beiden Rezeptoren für die Fertilität ausgeschlossen werden kann. Interessanterweise wurde jedoch in Männchen ohne einen funktionierenden Tas1r3- und α -Gustducin, eine gravierendere Einschränkung beobachtet, die zur männlichen Infertilität führt (Mosinger et al., 2013). Für diese Studie wurden genmanipulierte α -Gustducin- und Tas1r3-*knockout* Männchen verwendet, deren Tas1r3 durch den humanen und pharmakologisch blockierbaren Tas1r3 ersetzt wurde. Unter medikamentöser Therapie mit dem Lipidsenker Clofibrat ließ sich die Funktion des Tas1r3 vorübergehend inhibieren, wobei diese Männchen massive Pathologien wie Oligospermie und testikuläre Gewebeveränderungen entwickelten und sogar reversibel unfruchtbar wurden. Zwar konnte keine eindeutige Erklärung für diese Beobachtung gefunden werden, jedoch zeigte diese Untersuchung erstmals, dass womöglich eine distinkte Signalabfolge wichtig für eine regelgerechte Funktionalität im männlichen Reproduktionssystem ist.

Zusätzlich zu gustatorischen Signalproteinen und Tas1R, wurden auch zahlreiche Bitterrezeptoren im männlichen Reproduktionsgewebe nachgewiesen (Xu et al., 2013). In einer innerhalb der Arbeitsgruppe vorangegangenen Promotionsarbeit von Frau Dr. Dorke Meyer wurde die besonders starke Expression des Bitterrezeptors Tas2r131 im murinen Hodengewebe gezeigt (Meyer, 2013). Initiale Untersuchungen, die die Auswirkungen des fehlenden Tas2r131-Rezeptors auf den Reproduktionsphänotyp erfassen sollten, wurden dabei mit Hilfe einer Tas2r131-Reportermauslinie (Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}) durchgeführt. In diesen Mäusen wurde die fehlende codierende Sequenz des Tas2r131-Proteins durch eine Fluoreszenzkassette des *humanized renilla* grün-fluoreszierenden Proteins (hrGFP) ersetzt, dessen Expression unter der

Promotorkontrolle des ursprünglichen Tas2r131-Proteins stattfindet (Voigt et al., 2012). Obwohl die genmanipulierte Maus keinen Tas2r131-Rezeptor mehr exprimiert, ist durch die eingefügte Fluoreszenzkassette der endogene Expressionsort des Tas2r131-Gens anhand grün-fluoreszierender Zellen in Gewebeschnitten der Tas2r131-*knockin* Maus sichtbar.

Die Ergebnisse der ersten Analysen zeigten, dass Tas2r131-defiziente Männchen signifikant mehr Spermien produzieren als Tas2r131 Wildtyp-Männchen (Meyer, 2013). Während der Zucht der Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Mauslinie konnte außerdem beobachtet werden, dass aus Verpaarungen von Tas2r131 [+/+]-Weibchen und Tas2r131 [+/-]-Männchen signifikant mehr heterozygote Nachkommen hervorgehen, als nach den Mendelschen Vererbungsregeln zu erwarten wäre (Campbell et al., 2006). Die Ursache für die beobachtete Genotypverschiebung bei den Nachkommen könnte möglicherweise in der größeren Anzahl haploider Tas2r131-defizienter Spermien liegen, wodurch eine Vererbung des defizienten Chromosomensatzes wahrscheinlicher ist.

Die bis *dato* durchgeführten Untersuchungen der Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Mauslinie wurden an Tieren mit unterschiedlichen niedrigen genetischen Stammhintergründen durchgeführt (max. 96,9 %; N2-N5 Stammhintergrund). Um mögliche reproduktionsbiologische Einflüsse des Donorstamms zu reduzieren und die Tas2r131-defiziente Mauslinie weiterhin näher zu charakterisieren, sind weitere Untersuchungen an Mäusen mit einem höheren genetischen Stammhintergrund notwendig. Diese Studien sollen dann Aufschluss über eine Funktion des Tas2r131-Bitterrezeptors im männlichen Reproduktionssystem geben.

1.2.3.2 Extranasale Expression von olfaktorischen Proteinen

Neben Expressionsanalysen von Proteinen der Geruchs-Signalkaskade in olfaktorischen Sinneszellen gibt es zusätzliche Studien, die auf mRNA und/oder Proteinebene zeigen, dass eine Expression in einzelnen Zellen auch in Organen außerhalb der Nase und der Zunge, wie der Niere, der Blase, dem Thymus, der Schilddrüse, der Lunge und den männlichen Keimzellen nachweisbar ist (Braun et al., 2007; Flegel et al., 2013; Griffin et al., 2009; Neuhaus et al., 2009; Pluznick et al., 2013; Pluznick et al., 2009). Während die in Spermien nachgewiesenen olfaktorischen Rezeptoren möglicherweise zur chemotaktischen Orientierung im weiblichen Genitaltrakt notwendig sind (Fukuda et al., 2004; Spehr et al., 2003), wird für die OR-Expression in der Niere diskutiert, dass dort die chemosensorischen Proteine an der Filtrationsrate des Blutes beteiligt sind und sogar regulierend auf den Blutdruck einwirken können (Pluznick et al., 2013; Pluznick et al., 2009).

Neben den ORs wurden auch Komponenten der intrazellulären olfaktorischen Signalkaskade (G_{olf} , ACIII) in Organen wie der Blase, dem Thymus und der Schilddrüse festgestellt (Feldmesser et al., 2006; Kang et al., 2015). Dabei wurde erstmals auch gezeigt, dass das olfaktorische Markerprotein (OMP), dessen Expression normalerweise in neuronalen Geruchszellen stattfindet, auch in Zellen außerhalb des primären olfaktorischen Systems exprimiert wird; zusätzlich dazu hat sich gezeigt, dass in diesen OMP-positiven Zellen außerhalb der Nase auch weitere Geruch-assoziierte Proteine nachweisbar sind (Kang et al., 2015).

Das OMP ist ein kleines Protein, dessen Funktion nicht gänzlich aufgeklärt ist (Buiakova et al., 1996; Farbman and Margolis, 1980; Keller and Margolis, 1975). Während das OMP im olfaktorischen System als Marker zur Identifizierung von olfaktorischen Sinneszellen dient, könnte die Funktion des kleinen Proteins mit der Modulation des Geruchsempfindens zusammenhängen (Buiakova et al., 1996; Kwon et al., 2009; Lee et al., 2011; Reisert et al., 2007;

Smith et al., 2002). Gleichzeitig gibt es jedoch auch Hinweise auf eine Protein-interagierende Adapterfunktion des OMPs (Behrens et al., 2003; Reisert et al., 2007).

Neben dem OMP wird das erstmals im Gehirn nachgewiesene Gerüstprotein MUPP1 (engl.: *Multi-PDZ domain protein 1*) ebenso in olfaktorischen Sinneszellen exprimiert (Dooley et al., 2009; Ullmer et al., 1998). Auch für das MUPP1 wird eine mögliche Funktion als Adapter vieler chemosensorischer Signalproteine diskutiert, da es, anders als das OMP, aus 13 Proteininteraktionsdomänen aufgebaut ist (Carlson, 2000; Paysan and Breer, 2001). Aufgrund der gleichzeitigen Bindung mehrerer Signalproteine und der damit einhergehenden räumlichen Annäherung könnte MUPP1 möglicherweise eine schnelle und störungsfreie Signalweiterleitung sicherstellen, wie es bereits für das verwandte INAD (*inactivation no after potential D*) in Photorezeptorzellen von *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde (Dooley et al., 2009; Huber et al., 1996). Diese Theorie wird durch Befunde unterstützt, die zeigen, dass Desensitisierungsprozesse in der olfaktorische Reizweiterleitung durch MUPP1 reguliert werden und dadurch die zelluläre Antwort auf einen olfaktorischen Reiz verlängert wird (Baumgart et al., 2014; Dooley et al., 2009).

Anhand der zahlreichen Befunde über die ektope Expression chemosensorischer Proteine kann festgestellt werden, dass in vielen unterschiedlichen Regionen des Körpers gustatorische und olfaktorische Signalproteine exprimiert werden. Funktionelle Analysen zeigten hierbei, dass beispielsweise Geschmacksrezeptoren im Gastrointestinaltrakt kein Geschmacksempfinden ermöglichen, sondern endokrine Reaktionen auslösen, die Auswirkungen auf den Metabolismus des Organismus haben (Finger and Kinnamon, 2011; Hass et al., 2007; Hass et al., 2010). Aufgrund der nur in vereinzelten Zellen exprimierten chemosensorischen Proteine und der teilweise fehlenden spezifischen Antikörper gegen z. B. Geruchs- und Geschmacksrezeptoren ist die funktionelle Charakterisierung der ektopen Expression gustatorischer und olfaktorischer Signalproteine äußerst schwierig. Als hilfreiches Werkzeug haben sich hierfür transgene Mäuse bewährt, in denen die codierende Sequenz eines Gens entfernt und durch eine Fluoreszenzkassette eines Reportergens ersetzt wurde (Meyer et al., 2012; Voigt et al., 2012) oder die ein Fusionsprotein aus dem chemosensorischen Signalprotein und einem Fluoreszenzprotein exprimieren (Kusumakshi et al., 2015).

1.3 Zielsetzung

In jüngster Zeit wurde die extraorale Expression gustatorischer Signalproteine (Tas1R, Tas2R, α -Gustducin und TRPM5) u. a. im männlichen Reproduktionsgewebe beschrieben (Fehr et al., 2007; Meyer et al., 2012; Mosinger et al., 2013; Voigt et al., 2012). Dabei konnte der TRPM5-Ionenkanal, der für die Transduktion von süßen, bitteren und umami Geschmacksstoffen notwendig ist, sowohl in den Hodentubuli, als auch in den Leydig Zellen des Interstitialraums nachgewiesen werden (Li, 2013; Li and Zhou, 2012; Perez et al., 2002). Ähnlich wie anderen gustatorischen Signalproteinen, die im männlichen Reproduktionsgewebe exprimiert werden, ist jedoch die physiologische Rolle des TRPM5 für die männliche Fertilität bisher noch nicht detailliert untersucht worden. Daher sollte zunächst in immunhistochemischen Studien mit TRPM5-spezifischen Antikörpern das Expressionsmuster des TRPM5 im Hodengewebe überprüft und in reifen epididymalen Spermien bestimmt werden. Parallel dazu sollte der Reproduktionserfolg einer TRPM5-*knockout*-Mauslinie analysiert werden, indem Reproduktionsparameter wie die „Zeit zwischen den Würfen“, „Wurfgröße“, „Überlebensrate“ und „Geschlechterverteilung der Jungtiere“ quantitativ erfasst werden. Um festzustellen, ob ein potentieller Phänotyp dieser TRPM5-defizienten Mauslinie auf Defekte während der Spermatogenese zurückzuführen ist, sollten diese Studien mit morphologischen Analysen des Hodens adulter TRPM5-defizienter Männchen, quantitativen Bestimmungen apoptotischer Ereignisse während der Spermatogenese und Konzentrationsbestimmungen des Sexualhormons Testosteron kombiniert werden. Außerdem sollten Untersuchungen zur Morphologie und Funktionalität reifer epididymaler TRPM5-defizienter Spermien (z. B. Bestimmungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Akrosomreaktionsraten) durchgeführt werden, die damit auch Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion des TRPM5-Kanals während des finalen Fortpflanzungsprozesses erlauben.

Während die im Mausmodell durchgeführten Deletionen einzelner Vertreter der Tas1- und Tas2-Rezeptorfamilie sowie von α -Gustducin zu keinen schwerwiegenden Störungen der männlichen Fertilität führen (Meyer, 2013; Meyer et al., 2012), äußert sich das gemeinsame Ausschalten des Tas1r3- und α -Gustducin-Gens in der Sterilität männlicher Mäuse (Mosinger et al., 2013). Um die sich daraus ergebende Hypothese zu überprüfen, ob tatsächlich erst eine gleichzeitige genetische Deletion mehrerer Komponenten der gustatorischen Signalkaskade zu pathophysiologischen Veränderungen des männlichen Reproduktionspotentials führt, sollten durch gezielte Verpaarungen bereits existierender Gen-defizienter Mauslinien (Tas1r1, Tas2r131, TRPM5) zwei neue Mauslinien generiert werden, die neben einer Deletion des TRPM5 zusätzlich eine Gen-Deletion für den Tas1r1 bzw. Tas2r131 tragen. Für den Fall, dass bei den männlichen Mäusen dieser neuen Doppel-*knockout* Mauslinien, anders als bei den Tas1r3- α -Gustducin Doppel-*knockout*-Männchen, keine vollständige Sterilität zu beobachten ist, sollten die Tas1r1-TRPM5- und Tas2r131-TRPM5-defizienten Tiere im Vergleich zur reinen TRPM5-*knockout* Mauslinie hinsichtlich ihrer Fruchtbarkeit untersucht und eine reproduktionsbiologische Charakterisierung vorgenommen werden.

In diesem Zusammenhang sollte an der am Institut etablierten Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Reportermauslinie auch geprüft werden, worin die Ursache dafür liegt, dass aus Zuchtpaaren mit weiblichen Tas2r131 [+/-]- und männlichen Tas2r131 [+/-]-Elterntieren signifikant mehr Nachkommen mit einem heterozygoten Genotyp hervorgehen, als nach Mendelschen Vererbungsregeln zu erwarten ist. Dazu sollte mit Hilfe eines bisher nicht verfügbaren und daher

neu hergestellten Tas2r131 Peptidantikörpers die Hypothese überprüft werden, ob die beobachtete Genotypverschiebung unter den Nachkommen auf einen prozentual erhöhten Anteil Tas2r131-defizienter Spermien in heterozygoten Tas2r131 Eltern-Männchen zurückzuführen ist. Die Hypothese einer größeren Population an Tas2r131-defizienten Spermien in hetero- und homozygoten Männchen sollte zudem in weiterführenden Zuchtversuchen mit homozygot-defizienten Tas2r131-Männchen und heterozygoten Tas2r131-Weibchen einer beginnend kongenen Tas2r131-Mauslinie überprüft werden.

Neben der extraoralen Expression gustatorischer Signalmoleküle sollten in der vorliegenden Arbeit auch initiale Studien zur ektopen Expression von Proteinen durchgeführt werden, die sonst vorwiegend im olfaktorischen System beobachtet wurden. Dazu wurde das in olfaktorischen Neuronen nachgewiesene und die chemosensorische Reizweiterleitung regulierende Adapterprotein MUPP1 (Dooley et al., 2009) sowie das OMP ausgewählt, das in reifen, olfaktorischen Neuronen exprimiert wird und möglicherweise auch eine regulatorische Funktion in der olfaktorischen Signaltransduktionskaskade ausübt (Buiakova et al., 1996). Für diese Fragestellung sollten RT-PCR Analysen und immunhistochemische Untersuchungen an Organsystemen wie dem Gastrointestinaltrakt und dem respiratorischen System durchgeführt werden, da diese in den letzten Jahren bezüglich einer ektopen Expression von chemosensorischen Signalkomponenten besonders intensiv untersucht wurden. Bei einem positiven Nachweis einer MUPP1- bzw. OMP-Expression in diesen beiden Organsystemen sollten weiterführend Colokalisationsstudien mit weiteren Komponenten der olfaktorischen und gustatorischen Signalkaskade durchgeführt werden. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob die gleichen Zellen sowohl MUPP1 bzw. OMP als auch Signaltransduktionsproteine des Geruchs- und Geschmackssystems exprimieren. Dadurch könnte die Hypothese überprüft werden, ob MUPP1 und OMP gemeinsam mit olfaktorischen und gustatorischen Signalproteinen auch in einem extra-olfaktorischen System an einer funktionellen Regulation beteiligt sind.

2 Material

2.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidisulfat APS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bouin Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin BSA	Carl Roth, Karlsruhe
Ca ²⁺ -Ionophor A23187	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau	Carl Roth, Karlsruhe
desoxy-Nukleotid-5'-triphosphat (dNTPs)	Thermo Fisher, Darmstadt
4',6'-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe
Eosin Y-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
EtOH	Carl Roth, Karlsruhe
Eukitt Eindeckmedium	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation, Hamburg
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching (Österreich)
Formalin	Carl Roth, Karlsruhe
Fura-2AM	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
H ₂ SO ₄	Carl Roth, Karlsruhe
Hämalaun-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Lactat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Laminin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Luminol (3-Aminophtalhydrazid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt

NaOH	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natrium-Desoxycholat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NP-40	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Paraformaldehydlösung, 16 %	Science Services, München
Perchlorsäure (PCA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Percoll	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phenylmethysulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pluronic F-127 (10 % in H ₂ O)	Molecular Probes, Eugene (USA)
<i>Peanut agglutinin</i> (PNA), Fluoreszein- isothiocyanat (FITC)-gekoppelt	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>Peanut agglutinin</i> (PNA), Tetramethyl- rhodamin-isothiocyanat (TRITC)-gekoppelt	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protease Inhibitor <i>cOmplete</i> , Mini, EDTA-frei	Roche, Mannheim
Pyruvat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Roti Histol	Carl Roth, Karlsruhe
Roti Safe	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sigmacote	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sucrose	Carl Roth, Karlsruhe
Temed	Carl Roth, Karlsruhe
Tissue Tek	Leica Microsystems, Wetzlar
TO-PRO-3	Invitrogen, Karlsruhe
Triethanolamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trioctylamin	VWR, Ismaning
Triphenylphosphanoxid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Sofern nicht anders angegeben, wurden Standardchemikalien von Carl Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

2.2 Enzyme, Größenstandards und Kits

Enzym	Hersteller
<i>cAMP EIA Kit (RPN2251)</i>	GE Healthcare, München
<i>DNA Größenstandard (100 bp)</i>	Thermo Scientific, Darmstadt
<i>DNase I</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>Dream Tag DNA Polymerase</i>	Thermo Scientific, Darmstadt
<i>GeneAMP® rTth Reverse Transcriptase RNA PCR Kit</i>	Roche, Mannheim
<i>In situ Cell Death Detection Kit, TMR Red</i>	Roche, Mannheim
<i>NucleoSpin RNA II</i>	Macherey Nagel, Düren
<i>Proteinase K (recombinant, PCR Grade)</i>	Roche, Mannheim
<i>Proteingrößenstandard</i>	Biomol,
<i>RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Thermo Scientific, Darmstadt
<i>RNase A (Typ II-A ; R-500)</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>Trypsin</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.3 Antikörper

2.3.1 Primärantikörper

Antigen	Donor	Verdünnung IHC/ICC	WB	Hersteller
Adenylatzyklase III	Kaninchen	1 : 200		Santa Cruz, Heidelberg
Aktin	Kaninchen	1 : 500		Sigma-Aldrich, Deisenhofen
GFP	Kaninchen	1 : 200	1 : 1000	Invitrogen, Karlsruhe
Gustducin	Kaninchen	1 : 500	1 : 1000	Santa Cruz, Heidelberg
G _{olf}	Kaninchen	1 : 200		Santa Cruz, Heidelberg
MUPP1, PDZ 5+6	Kaninchen	1 : 200		PD Dr. Boekhoff, Walther-Straub-Institut, München
OMP	Ziege	1 : 200	1 : 10.000	Wako Chemicals, Neuss
Tas2r131 C-terminal (Kaninchen 842+843)	Kaninchen	1: 50		PD Dr. Boekhoff, Walther-Straub-Institut, München
Tas2r131 N-terminal (Kaninchen 842+843)	Kaninchen	1: 50		PD Dr. Boekhoff, Walther-Straub-Institut, München
TRPM5	Kaninchen	1 : 200		Prof. Chubonov, Walther-Straub-Institut, München

2.3.2 Sekundärantikörper

Antigen	Donor	Verdünnung		Hersteller
		IHC/ICC	WB	
anti-Kaninchen Peroxidase-gekoppelt	IgG, Ziege		1 : 7500	Bio-Rad, München
anti-Kaninchen FITC-gekoppelt	IgG, Ziege	1:500		Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-Kaninchen Alexa Fluor 546-	IgG, Esel	1:500		Invitrogen, Karlsruhe
anti-Ziege Fluor 488	IgG, Alexa Esel	1:500		Invitrogen, Karlsruhe

2.4 Primer

2.4.1 Primer für die Genotypisierung

Allel	Produktlänge	Sequenz
<i>Tas1r1 mCherry</i>		
Tas1r1 WT	711 bp	5' GAATCCACCTGGTTTCCATCCACGTC 3' 5' CTCTCAGGGTGACTTCAGTCTTTAGAGATGG 3'
mCherry Ki	462 bp	5' GAATCCACCTGGTTTCCATCCACGTC 3' 5' GTTGTTGGGGCACTCCATGTTGCT 3'
<i>Tas2r131 hrGFP</i>		
Tas2r131 WT	455 bp	5' GCACACAAGTGATGATGTGGGCATAGAG 3' 5' GTTCTTGACCCAGTCAGAGCAGTTTGC 3'
hrGFP Ki	368 bp	5' AAGTACCCCGAGGACATCAGCGACTTCTTC 3' 5' ATGAAGTGGTACTCGGGGAAGTCCTTCACC 3'
<i>Trpm5</i>		
TRPM5 WT	346 bp	5'CTAGACACACGGTAGACAGAGTCAG 3'
TRPM5 WT / KO		5'CCTGTCGGATTTCTCCAGCACCAG 3'
TRPM5 KO	575 bp	5'GACGAGTTCTTCTGAGGGGATCGATC 3'

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

2.4.2 Primer für die RT-PCR

Allel	Accession number	Tm °C	Produktlänge	Sequenz
<i>ACIII</i>	NC_000078.6	60	497 bp	5'GGTGGTCTTTGCGGCCCTCTTTC 3' 5'CTTGCGGTCCTTGCGGTCTGC 3'
<i>Aktin</i>	NM_007393.5	60	425 bp	5'GGCTACAGCTTCACCACCAC 3' 5'GAGTACTTGGCGTCAGGAGG 3'
<i>Golf</i>	NM_177137.5	60	484 bp	5'TTCTTGAGGATCAGCACAGCCA 3' 5'TCTCACTTGGGTGACACTGCA 3'
<i>OMP</i>	NM_011010.2	62,7	682 bp	5'AAGCTGCAGTTCGATCACTG 3' 5'TGTCCTGTCCAGTCTCAGTCT 3'
<i>Trpm5</i>	NM_020277.2	60	778 bp	5'CAGGGCTTCTTCACAGATGAG 3' 5'GCAAGTCTCTCTCCAGATGTTG 3'

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

2.4.3 Primer für die *in situ* RT-PCR

Allel	Accession number	Tm °C	Produktlänge	Sequenz
β-Aktin	NM_001101.03	59 60	79 bp	5'ATTGGCAATGAGCGGTTC 3' 5'CGTGGATGCCACAGGACT 3'
Trpm5	NM_014555.3	59 60	104 bp	5' AAGGTCCGTGTGGTTGCT 3' 5' TCCTCAGGGTAGTGGACAGG 3'
OMP	NM_006189.1	60 60	63 bp	5' CAGCGGAGTCTGTGTACCG 3' 5' TCCAGCGCTCGAACTGTAG 3'

In situ RT-PCR-Primer wurden von der Firma Eurofins synthetisiert. Das Fluoreszenzprotein AT488 wurde an das 5'-Ende angeheftet.

2.5 Puffer

Anodenpuffer I

300 mM Tris
20 % Methanol (v/v)

Bradford-Stammlösung

0,1 % Coomassieblau G250 (w/v)
In Ethanol

Citratpuffer

100 mM Natriumcitrat
100 mM Citronensäure

ECL-Reagenz

ECL Lösung 1 : ECL Lösung 2 (1:1)

ECL Lösung 2

0,018 % H_2O_2
100 mM Tris/HCl
pH 8,5

HS Stammlösung

270 mM NaCl
10 mM KCl
2 mM MgSO_4
4 mM CaCl_2

HS+ (HS/ NaHCO_3)

HS Puffer
+ 15 mM NaHCO_3 (Natriumhydrogencarbonat)
pH 7,4

Anodenpuffer II

25mM Tris
20 % Methanol (v/v)

Bradford-Reagenz

5 % Bradford Stammlösung (v/v)
8,5 % ortho-Phosphorsäure (v/v)

Coomassie-Färbelösung

0,04 % Coomassieblau G250
50 % Methanol
10 % Essigsäure
40 % H_2O

ECL-Lösung 1

1 % Luminol-Stocklösung
0,44 % Stabilisator Stocklösung
100 mM Tris/HCl
pH 8,5

Gefrierschnitt-Fixierungspuffer / 4 % PFA

16 % Paraformaldehyd (v/v)
20 ml dd H_2O
10 ml NaPI-Puffer
pH 7,4

HS Puffer

135 mM NaCl (HS Stammlösung 1:2)
5 mM KCl (HS Stammlösung 1:2)
1 mM MgSO_4 (HS Stammlösung 1:2)
2 mM CaCl_2 (HS Stammlösung 1:2)
5 mM Glukose
30 mM HEPES (1 M Stock, pH 7,4)
10 mM Lactat (60 % w/w Sirup)
1 mM Pyruvat
pH 7,4

HTF-Puffer

100 mM NaCl
5 mM KCl
0,2 mM MgSO_4
5 mM CaCl_2 (HS Stammlösung 1:2)
3 mM Glukose

18 mM Lactat (60 % w/w Sirup)
 0,34 mM Pyruvat
 0,2 mM Penicillin G
 70 µM Streptomycin
 25 mM NaHCO₃
 0,4 % BSA
 0,0002 % Phenolrot

Kapazitierungspuffer (HS/NaHCO₃/BSA)

HS Puffer
 + 15 mM NaHCO₃ (Natriumhydrogencarbonat)
 + 0,5 % BSA
 pH 7,4

Kathodenpuffer

40 mM ε-Aminocapronsäure
 20 % Methanol (v/v)

Luminol-Stocklösung

444 mg Luminol in 10 ml DMSO

NaPI-Puffer

100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄
 pH 7,4

PBS

150 mM NaCl
 1,4 mM K₂HPO₄
 8 mM Na₂HPO₄ pH 7,4

Probenpuffer für Agarosegel, 5x

0,25 % Bromphenolblau
 40 % Glycerin, in 1 x TAE-Puffer

Puffer B

25 nM EDTA
 75 mM NaCl
 pH 8,0

Sammelgelpuffer, 4x

500 mM Tris/HCl
 0,4 % SDS
 pH 6,8

SDS-Ladepuffer, 4x

250 mM Tris/HCl, pH 6,8
 0,08 % Bromphenolblau
 8 % SDS
 20 % Glycerin
 10 % β-Mercaptoethanol

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris
 0,1 % SDS
 190 mM Glycin

Spermienfixierpuffer (Coomassiefärbung)

20 mM Na₂HPO₄
 150 mM NaCl
 7,5 % Formaldehyd

Spermien-Postfixierpuffer (Coomassiefärbung)

100 mM Ammoniumacetat
 pH 9,0

Stabilisator-Lösung0,15 g ϵ -Aminocapronsäure in 10 ml DMSO**TAE-Puffer**

40 mM Tris
 20 mM Essigsäure
 2 mM EDTA
 pH 8,3

TBST

10 mM Tris
 150 mM NaCl
 0,05 % Tween 20 (v/v)
 pH 7,4

Trenngelpuffer, 4x

1,5 M Tris/HCl
 0,4 % SDS
 pH 8,8

2.6 Gebrauchswaren

Artikel	Hersteller
Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe
Deckgläser rund 24mm	VWR, Darmstadt
Dounce-Homogenisator	Kontes, Vineland (USA)
EDTA-Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Falcons (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Fettstift (Dako Cytomation Pen)	Dako Cytomation, Hamburg
Filterpapier	GE Healthcare, München
Frame-Seal	Bio Rad, München
Glasküvetten	A. Hartenstein, Würzburg
Kanülen (23 G)	Braun, Melsungen
Mikroküvetten	Sarstedt, Nürnberg
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, München
Objekttäger	Carl Roth, Karlsruhe
Objektträger, beschichtet	Menzel, Braunschweig
Petrischalen (Durchmesser?)	Sarstedt, Nürnberg
pH-Indikatorpapier	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pipettenspitzen (10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße (1.5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Schlauchfolie (0,2 mm)	Rische + Herfurth, Hamburg
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Spritzen (1ml)	Braun, Melsungen
Stickstoff	Linde AG, Pullach
Wägeschälchen	A. Hartenstein, Würzburg
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nürnberg

2.7 Geräte

Gerät	Hersteller
-80 °C Schrank	Eppendorf, Hamburg
Agarose-Gelelektrophorese System	Peqlab, Erlangen
Calcium Imaging System:	
- CCD Kamera (Ixon +)	Andor, Belfast (Nordirland)
- Fluoreszenzmikroskop, IX70	Olympus, Hamburg
- TILL Photometry System (Polychrome V)	T.I.L.L. Photonics, Martinsried
Chemilumineszenz-System (Chemismart)	Peqlab, Erlangen
Cryostat (Leica CM 3050 S)	Leica Microsystems, Wetzlar
Einbettstation (EG 1150)	Leica Microsystems, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop Olympus, IX71	Olympus, Hamburg
FLUOstar Omega	BMG LABTECH, Offenburg
Gellaufkammer, SDS-Gel	Bio-Rad, München
Heizblock (HTMR 131)	Peqlab, Erlangen
Infiltrationsautomat (TP 1020)	Leica Microsystems, Wetzlar
IVOS Sperm Analyzer	Hamilton Thorne Research, Beverly (USA)
Kälteplatte	Leica Microsystems, Wetzlar
Konfokales Mikroskop (LSM 510 Meta)	Zeiss, Jena
Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riß
Kühlzentrifuge mit Ausschwingrotor (5804 R)	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop	Olympus
Magnetrührer	Thermo Scientific, Darmstadt
Messkammer	Werkstatt der Philipps-Universität Marburg
Mikrowelle	Severin, Sundern
Mörser und Pistill	A. Hartenstein, Würzburg
Neubauerzählkammer	Brand, Wertheim
pH Meter	Mettler-Toledo, Gießen
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Peqlab, Erlangen
Power Supply (Power Pack 35/60 + EV231)	Peqlab, Erlangen
Rotationsmikrotom (Accu-Cut SRM 200)	Leica Microsystems, Wetzlar
Schüttler	Bachofer, Reutlingen
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Taumler (Polymax)	Heidolph, Schwabach
Thermocycler	Peqlab, Erlangen
Thermocycler Primus in situ	Peqlab, Erlangen
Ultra-turrax	Ika, Staufen
UV-Geldokumentations System	Peqlab, Erlangen
Waage	Kern, Balingen
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Wasserbad (WBU 45)	Memmert, Schwabach
Wasserbad (Histologie)	Leica Microsystems, Wetzlar

Western Blot Apparatur, Semi-Dry	Bio-Rad, München
Wippe (Duomax)	Heidolph, Schwabach
Zellinkubator	Thermo Scientific, Darmstadt
Zentrifugen (Biofuge Stratos, Biofuge Pico 17, Biofuge Fresco 21)	Heraeus, Hanau

2.8 Mäusstämme

Stamm	Herkunft
C57BL/6N	Janvier, St. Berthevin, Frankreich
Balb/C	Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU, München
Tas1r1 ^{BL-IRES-mCherry} und Tas2r131 ^{BL-IRES-hrGFP}	Dr. Anja Voigt, AG Prof. Meyerhof, DIfE, Potsdam
Mauslinien, generiert durch Gene-Targeting-Strategie. Gesamte Tas1r1- bzw. Tas2r131-codierende Sequenz ersetzt durch Targeting (Knockin)-Konstrukt, bestehend aus synaptischen Markerprotein Gerstenlektin (<i>barley lectin</i> (BL)), IRES (<i>internal ribosomal entry site</i>), Fluoreszenzprotein (<i>mCherry/hrGFP</i> ; <i>Knockin</i> -Kassette) und LoxP-Erkennungsstelle. Die Mutation führt dazu, dass die Fluoreszenzproteine anstelle des Rezeptors exprimiert werden. Die Expression findet unter der Promotorkontrolle des entsprechenden Geschmacksrezeptors statt.	
TRPM5 KO	Jackson Laboratory, USA
Maus, generiert durch Gene-Targeting-Strategie von Deltagen, Inc. (<i>Trpm5</i> ^{tm1Dgen}). Die Sequenz 2133-2306 wurde entfernt und durch eine Neomycin-Kassette ersetzt. Durch das Fehlen des Exon 16, wird kein funktioneller Rezeptor exprimiert.	
TRPM5-IC/eR26-τGFP	Prof. Ulrich Boehm, Universität des Saarlandes, Homburg
TRPM5-IC Mauslinie, generiert durch Gene-Targeting-Strategie, enthält eine TRPM5-IRES-CRE (<i>internal ribosomal entry site – cre recombinase</i>). Diese wurde verpaart mit einer eR26-τGFP Reportermauslinie. In TRPM5-IC/eR26-τGFP Doppel- <i>knockin</i> Mäusen wird τGFP unter der TRPM5-Promotorkontrolle exprimiert und kennzeichnet Zellen, in denen TRPM5 exprimiert wird.	

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 mRNA Isolierung aus unterschiedlichen Geweben

Mit der RT-PCR kann auf mRNA-Ebene eine Genexpression in einem distinkten Gewebe nachgewiesen werden. Die dafür notwendige mRNA wurde aus einem frisch isolierten und in flüssigen Stickstoff schockgefrorenem, oder bei -80 °C gelagertem, Organ gewonnen. Für die mRNA-Aufreinigung wurde das *NucleoSpin RNA II* Kit (Macherey & Nagel) verwendet; dessen Prinzip im Folgenden kurz erläutert wird: Das Organ, aus dem die mRNA gewonnen werden sollte, wurde aus einer Maus, die durch einen Genickbruch getötet wurde, entnommen und sofort in flüssigen Stickstoff überführt, um eine Degradation der mRNA zu vermeiden. In einem vorgekühlten Mörser wurde das Gewebe mit flüssigem Stickstoff zermahlen und ca. 30 mg des Gewebepulvers für die anschließende mRNA Isolierung eingesetzt. Mit einem Lysepuffer und β -Mercaptoethanol wurden die Zellen aufgebrochen, Proteine denaturiert und ubiquitär vorhandene RNasen inaktiviert. Das Lysat wurde auf eine Silica-Membran gebracht, an die RNA und DNA binden konnten. Eine Kontaminierung durch genomische DNA wurde vermieden, indem die Membran mit rDNase behandelt wurde. Durch anschließende Waschschriffe, mit einem dem Kit beiliegenden Waschpuffer, wurden Salze und hochmolekulare Zellkomponenten entfernt. Die an der Membran anhaftende mRNA wurde abschließend mit 60 μ l RNase-freien Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.1.2 cDNA Synthese

Die isolierte mRNA eines Gewebes kann für den RT-PCR-basierten Nachweis einer Genexpression verwendet werden. Für diesen Vorgang ist eine Umschreibung der mRNA in komplementäre DNA (engl.: *complementary DNA* (cDNA)) notwendig, da mRNA durch ubiquitär vorhandene RNasen sehr instabil ist und RNA-Polymerasen sehr fehleranfällig sind. Die Umschreibung von mRNA in cDNA basiert auf einer viralen reversen Transkriptase (Buell et al., 1978). Diese wurde zusammen mit weiteren Komponenten des *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits* (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers zu einem Reaktionsansatz zusammen pipettiert und zu 8 μ l der isolierten mRNA (siehe 3.1.1) hinzugegeben. Neben Oligo(dT)-Primern (Stock: 100 μ M, 2 μ l), welche sich an den Poly-A-Schwanz der isolierten mRNA heften können, enthielt das Reaktionsgemisch außerdem 2 μ l eines Desoxyribonukleotid (dNTP)- Mixes (Stock: 10 mM) und 8 μ l ddH₂O. Der Synthese-Mix wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert und nach Abkühlen mit 8 μ l 5x Reaktionspuffer, 8 μ l MgCl₂ (Stock: 25 mM), 2 μ l RNase Inhibitor (Stock: 20 U/ μ l) und 2 μ l viraler Reversen Transkriptase (Stock: 200 U/ μ l) versetzt. In einem Thermocycler erfolgte die Umschreibung der mRNA in cDNA durch eine 50 min Inkubation bei 50 °C und eine sich direkt anschließende Inkubation bei 85 °C für 5 min. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die erfolgreiche Umschreibung der mRNA in cDNA wurde in einer PCR-Reaktion mit Primerpaaren für das konstitutiv exprimierte Haushaltsgen β -Aktin überprüft, dessen Expression unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen ist (siehe 3.1.3.1). Um eine mögliche mRNA-Kontamination der cDNA-Probe auszuschließen, wurde stets eine

Negativkontrolle mitgeführt, der statt mRNA ddH₂O zugesetzt wurde. Die generierten Amplifikationsproben wurden im Anschluss an die Reaktion gemeinsam mit einem DNA-Größenmarker auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen und der Größe nach separiert. Mit UV-Licht konnten anschließend die Banden hinsichtlich ihrer Größe bestimmt werden. Bei erfolgreicher cDNA-Synthese wurde mit dieser Probe eine PCR mit Primer-spezifischen Anlagerungstemperaturen durchgeführt (siehe 3.1.3.1).

3.1.3 Varianten der PCR

Mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist es möglich *in vitro* DNA-Fragmente enzymatisch zu amplifizieren. Hierfür sind Oligonukleotidprimer notwendig, die sich an die Matrizen-DNA (*template*) heften. Dadurch kann die thermostabile DNA-Polymerase freie dNTPs komplementär an den bereits bestehenden DNA-Strang hybridisieren und einen neuen doppelsträngigen DNA-Strang synthetisieren (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1985).

3.1.3.1 Standard-PCR

Das Standardprogramm einer PCR setzt sich aus einer variablen Anzahl von Reaktionswiederholungen der Einzelschritte Denaturierung, Anlagerung (*Annealing*) und Elongation zusammen. Die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C führt zur Trennung der DNA-Stränge, so dass sich die im Überschuss vorhandenen, spezifischen Oligonukleotidprimer in der Anlagerungsphase an das einzelsträngige *template* anheften können. Die passende Temperatur für diesen Reaktionsschritt ist hierbei Primer-spezifisch. Während der Elongationsperiode verlängert die DNA-Polymerase bei ihrem Temperaturoptimum von 72 °C den vorwärts (*forward*)- und rückwärts (*reverse*)-Primer, so dass wieder eine doppelsträngige DNA entsteht, die exakt der Ausgangs-DNA entspricht. Auf diese Weise kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der eingesetzten DNA-Menge.

Die Einzelkomponenten eines Reaktionsansatzes wurden folgendermaßen eingesetzt: 2,5 µl 10x Reaktionspuffer, je 1 µl *sense*- und *antisense* Primer (Stock: 10 µM), 0,5 µl dNTP-Mix (Stock: 10 mM) und 0,125 µl Dream Taq Polymerase (Stock: 5 U/µl). Dieser Reaktionsmix wurde mit ddH₂O auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt und in einen Thermocycler überführt, in dem die Abfolge der zeit- und temperaturabhängigen Einzelschritte der PCR-Reaktion automatisiert ablaufen (Tabelle 1). Im Anschluss an die Reaktion wurde die amplifizierte DNA mit 5x Ladepuffer versehen und auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen, so dass mittels UV-Licht Detektion eine Überprüfung der Produktlänge stattfinden konnte (siehe 3.1.4).

3.1.3.2 Touchdown-PCR

Während der PCR finden häufig Vervielfältigungen eines DNA-Abschnitts durch unspezifische Primer-Anlagerungen statt, die ein spezifisches Signal überdecken können (Don et al., 1991). Zur Vermeidung unspezifischer Amplifikationsprodukte wurde das Prinzip der „*Touchdown-PCR*“ angewendet. Hierbei wurde in den ersten zehn Zyklen eine hohe *Annealing*-Temperatur ausgewählt, wodurch äußerst spezifische Amplifikationsprodukte entstehen. Eine graduelle Erniedrigung der Temperatur führte zur Vervielfältigung der spezifischeren Amplifikate. Diese Methode wurde bei der Genotypisierung gentechnisch veränderter Mäuse eingesetzt (siehe 3.2.2).

Tabelle 1: PCR-Programm einer Standard-PCR.

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	5	
Denaturierung	94	1	} 35 x
Anlagerung	60	1	
Elongation	72	1	
Finale Elongation	72	5	
Lagerung	4	∞	

3.1.3.3 *In situ* RT-PCR

Die Methode der *in situ* RT-PCR kombiniert die zelluläre Auflösung der üblichen molekularbiologischen *in situ* Hybridisierung, mit der hohen Empfindlichkeit einer klassischen RT-PCR (siehe 3.1.3.1). Während mit der *in situ* Hybridisierung mRNA durch Oligonukleotidsonden direkt im Gewebe nachgewiesen und der genaue Proteinexpressionsort ermittelt wird, wird mit der RT-PCR mRNA in cDNA umgeschrieben und über Primerpaare während einer PCR-Reaktion ein spezifischer Genabschnitt amplifiziert (siehe 3.1.3). Unter Verwendung Fluoreszenz-gekoppelter Primerpaare (Fluoreszenzsonden) erlaubt die *in situ* RT-PCR eine mikroskopische Lokalisation der durch RT-PCR entstandenen und amplifizierten cDNA. Die Methode kombiniert eine morphologische Gewebeanalyse mit der Sensitivität der RT-PCR und ermöglicht unter Ausschluss einer Antikörper-Verwendung die Detektion einer Proteinexpression im Gewebe (Bagasra et al., 1992; Korkmaz et al., 2005).

Die Durchführung der *in situ* RT-PCR wurde mit der Unterstützung der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Wilhelm Bloch an der Sporthochschule in Köln durchgeführt. Vor Beginn der enzymatischen Reaktion auf humanen Gewebeschnitten der Lunge, wurden diese 15 min mit 2 µg/ml Proteinase K (in ddH₂O gelöst) und 5 mM CaCl₂ bei 37 °C behandelt. Diese Behandlung führte dazu, dass Proteine im Gewebe verdaut und Nukleinsäuren für die spätere Detektion durch die Polymerase freigesetzt wurden. Die höchste Konzentration der Proteinase K und die längste Dauer der Inkubationszeit, die mit noch keinem Gewebeabbau einherging, wurden über Vorversuche ermittelt. Durch eine 2 min Inkubation bei 95 °C und anschließendes Waschen in 1x PBS und ddH₂O wurde die Reaktion beendet. Als Nächstes wurden die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur (RT) an der Luft getrocknet und der Master Mix für die PCR-Reaktion (75 µl/Schnitt) aus den Komponenten des *GeneAMP® rTth Reverse Transcriptase RNA PCR Kits* (Roche) pipettiert. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 36,75 µl ddH₂O, 15 µl 5x Reaktionspuffer, 2,25 µl dNTPs (Stock: 10 mM), 7,5 µl Mangan(II)-Acetat (Mn(OAc)₂ (Stock: 25 mM), 3,75 µl RNase Inhibitor (Stock: 2,5 µM), 3,75 µl Oligo d(T)₁₆-Primer (Stock: 50 µM), je 1,5 µl *sense*- und *antisense* Primer (Stock: 100 pmol/µl) und 3 µl der thermostabilen rTth-Polymerase (Stock: 1 U/µl). Eine Vermischung der Flüssigkeiten auf den einzelnen Gewebeschnitten eines Objektträgers wurde verhindert, indem um jeden zu untersuchenden Schnitt ein Silikon Dichtungsrahmen geklebt wurde. In die räumlich getrennten „Inkubationskammern“ wurden 60 µl des Master Mix pipettiert. Damit aufgrund der Wärmeentwicklung der Master Mix nicht verdunstet, wurde die Inkubationskammer mit einer dünnen Plastikfolie abgedichtet. Anschließend wurden die vorbereiteten Objektträger auf den

Aufsatz für Objektträger in den Primus *in situ* Thermocycler (MWG Biotech) gelegt und das PCR-Programm gestartet (Tabelle 2). Nach der Umschreibung von mRNA in cDNA und der anschließenden cDNA-Amplifikation wurden die Plastikfolie und der Dichtungsrahmen entfernt und der Gewebeschnitt mit einem Fluoreszenz-Einbettmedium und einem Deckglas eingedeckelt. Die mikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte fand an der Sporthochschule Köln unter der Anleitung von Prof. Dr. Wilhelm Bloch an einem konfokalen Mikroskop (LSM 710, Zeiss) statt.

Tabelle 2: *In situ* RT-PCR Programm für Reverse Transkription und Amplifikation.

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Reverse Transkription	42	15	
Denaturierung	99	5	
Kühlen	5	5	
Initiale Denaturierung	95	2	} 40 x
Denaturierung	95	1	
Anlagerung + Elongation	58	1	
Finale Elongation	72	10	
Lagerung	4	∞	

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird in der Molekularbiologie angewendet, um amplifizierte DNA-Stränge aufzutrennen und deren Größe im Vergleich zu DNA-Standards, mit bekannter Basenpaargröße zu bestimmen (Sharp et al., 1973).

Für ein 1,5 % Agarosegel wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) unter Kochen gelöst. Der abgekühlten, verflüssigten Agarose wurden 5 µl des DNA-Farbstoffs *Roti-Safe* zugegeben und gründlich gemischt. Das Gel wurde anschließend zügig in einen Gelschlitten gegossen, von Luftblasen befreit und mit einem Taschenkamm versehen. Sobald das Agarosegel ausgehärtet war, wurde das Gel in die mit Laufpuffer (1x TAE-Puffer) gefüllte Elektrophoresekammer überführt und die Kämmen entfernt. Die mit einem 5x Ladepuffer versehenen DNA-Proben wurden anschließend gemeinsam mit einem DNA Größenmarker aufgetragen und ein elektrisches Feld angelegt. Nukleinsäuren sind negativ geladene Moleküle und wandern entsprechend ihrer molekularen Masse zur Anode. Kleinere Amplifikationsprodukte bewegten sich schneller durch die Siebstruktur des Agarosegels, als hochmolekulare Produkte. Durch den anfangs zugegebenen DNA-bindenden Farbstoff, konnten die derart separierten Amplifikationsprodukte mit Hilfe einer UV-Licht-Gel-Dokumentationsstation visualisiert werden.

3.2 Arbeiten mit Mäusen

3.2.1 Haltung und Zucht

Die für diese Arbeit verwendeten Mäuse wurden in der Tierhaltungsanlage des Walther-Straub-Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München gehalten. Die Mäuse befanden sich dauerhaft getrenntgeschlechtlich in individuell belüfteten Käfigen (*individually ventilated cages* (IVC)) und waren einem 12 h Lichtrhythmus, 22 °C RT und 50 % Luftfeuchtigkeit ausgesetzt. Wasser und Nahrung standen ihnen *ad libitum* zur Verfügung. Zuchttiere wurden kontinuierlich und monogam verpaart und Jungtiere nach drei Wochen von den Eltern entwöhnt. Zum Zeitpunkt des Absetzens wurden die Jungtiere mit einem Ohrloch versehen und eine Schwanzspitzenbiopsie für die Bestimmung des Genotyps vorgenommen (3.2.2).

Für die vorliegende Arbeit wurden Organentnahmen am getöteten Tier vorgenommen. Das „Töten von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“ (Organentnahme) war zu dem Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit weder anzeige-, noch genehmigungspflichtig. Der laut dem § 4 (1a) erforderliche Sachkundenachweis (Felasa C Kurs) wurde erbracht und die korrekte Vorgehensweise von der Tierschutzbeauftragten, Frau Dr. Eibicht-Weber, überprüft.

Tiere, deren Organe in dieser Arbeit zu Untersuchungszwecken verwendet wurden, wurden vor der Organentnahme oder der Blutentnahme mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran betäubt und durch einen Genickbruch getötet.

Für funktionelle Untersuchungen wurden ausschließlich Tas1r1-mcherry bzw. Tas2r131-hrGFP Mäuse verwendet, die in sechster Generation auf C57BL/6N (98,4 % C57BL/6N-Stammhintergrund) zurückgekreuzt waren. Als Kontrolltiere wurden Geschwister, Wildtyp-Tiere der gleichen Mauslinie und des gleichen genetischen Hintergrunds oder C57BL/6N-Mäuse verwendet. Die Angabe des entsprechenden Kontrolltiers erfolgt in den jeweiligen Ergebnisbeschreibungen.

3.2.1.1 Analyse des Reproduktionserfolgs

Zur Analyse des Reproduktionserfolgs wurden die Zeiten zwischen dem Zuchtbeginn und dem ersten Wurf eines Zuchtpaares (= Zeit bis zum 1. Wurf) sowie die Zeiten zwischen den einzelnen Würfen eines Paares (= Wurfabstand) protokolliert. Die Größe eines Wurfes wurde in seiner Gesamtzahl (Weibchen und Männchen) direkt nach der Geburt festgehalten und die Geschlechterverteilung ermittelt. Daten von Zuchtpaaren des gleichen Verpaarungsansatzes wurden vereint, das arithmetische Mittel gebildet und auf Abweichungen zu erfassten Daten aus hausinternen C57BL/6N-Wildtyp-Zuchten untersucht.

3.2.1.2 Analyse der Lebenserwartung neugeborener Jungtiere

Neben der Untersuchung des Reproduktionserfolgs der verwendeten Mauslinien (siehe 3.2.1.1), wurde die durchschnittliche Lebenserwartung von neugeborenen Jungtieren in den ersten drei Lebenswochen bestimmt. Todesfälle innerhalb eines Wurfes wurden anteilig zur Wurfgröße festhalten und für jeden Verpaarungsansatz das arithmetische Mittel gebildet und dieses mit Daten der C57BL/6N-Zucht verglichen.

3.2.1.3 Analyse der Genotypverteilung nach G. Mendel

Die Nachkommen jedes Zuchtpaares wurden genotypisiert (siehe 3.2.2) und die Genotypverteilung im Vergleich zu den Vererbungsregeln genetischer Merkmale nach Gregor Mendel berechnet (Campbell et al., 2006). Die Verteilung der einzelnen Genotypen innerhalb eines Verpaarungsansatzes wurde anteilig auf die Gesamtzahl der beobachteten Tiere berechnet. Diese Ergebnisse wurden abschließend mit der zu erwartenden Genotyp-Verteilung über den statistischen Chi-Test verglichen.

3.2.2 Genotypisierung

3.2.2.1 Schwanzspitzenverdau

Die Bestimmung des Genotyps von gentechnisch veränderten Mäusen erfolgte PCR-basiert an extrahierter, genomischer DNA, die aus Schwanzspitzenbiopsien gewonnen wurde (siehe 3.2.1). Die frisch gezwickten, oder kurzzeitig bei 4 °C gelagerten Schwanzspitzen wurden über Nacht in 330 µl eines Puffergemischs (Puffer B, versetzt mit 10 % SDS und 1 mg/ml Proteinase K) bei 55 °C in einem Wasserbad inkubiert.

3.2.2.2 DNA-Isolation

Die verdauten Schwanzspitzen wurden mit 1,5 µl RNase A (Stock: 10 mg/ml) versehen und für 30 min bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 100 µl gesättigter NaCl-Lösung (35 % w/v in ddH₂O) verdünnt, wodurch es zu einer Neutralisierung der Probe kam. Nach einer 15 min Schüttelperiode bei RT wurden Gewebereste durch eine Zentrifugation für 30 min bei 16.000 g pelletiert und die DNA im Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Fällung erfolgte durch die Zugabe von 860 µl 100 % Ethanol (EtOH) und einer weiteren Zentrifugation für 15 min bei 16.200 g. Die präzipitierte DNA wurde mit 500 µl 70 % EtOH versetzt und erneut für 5 min bei 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die pelletierte DNA bei RT getrocknet (2-3 h). Das DNA-Pellet wurde in 100 µl ddH₂O aufgenommen und für Genotyp-Bestimmungen verwendet (siehe 3.2.2).

3.2.2.3 PCR

Der zu typisierende DNA-Abschnitt wurde aus der extrahierten, genomischen DNA (siehe 3.2.2.2) in einer PCR *in vitro* amplifiziert, indem spezifische DNA-Primer eingesetzt wurden, die eine Vervielfältigung der Gensequenz von beiden Seiten beschränkten (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1985). Die Zusammensetzung der Komponenten der PCR-Reaktion zur Genotypisierung glichen der einer Standard-PCR (siehe 3.1.3.1), wohingegen das PCR-Programm nach dem „Touchdown-Prinzip“ aufgebaut war (siehe 3.1.3.2). Nach Ablauf der Amplifikation der entsprechenden DNA-Abschnitte wurden die PCR-Proben mit 5x Ladepuffer versehen, in einer Agarose-Gelelektrophorese der molekularen Masse nach aufgetrennt und mit UV-Licht angeregt (siehe 3.1.4).

Tabelle 3: PCR-Programm zur Genotypisierung der Mauslinien Tas1r1^{BL-IRES-mCherry} und Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}.

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	15	
Denaturierung	95	1	} 5 x
Anlagerung	65	0,45	
Elongation	72	3	
Denaturierung	95	1	} 30 x
Anlagerung	63	0,45	
Elongation	72	3	
Finale Elongation	72	10	
Lagerung	4	∞	

Tabelle 4: PCR-Programm zur Genotypisierung der TRPM5-*knockout*-Mauslinie.

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5	
Denaturierung	95	0,5	} 10 x
Anlagerung	70	0,5	
Elongation	72	1	
Denaturierung	95	0,5	} 35 x
Anlagerung	59	0,5	
Elongation	72	1	
Finale Elongation	72	5	
Lagerung	4	∞	

3.2.3 Spermienisolation aus dem Nebenhoden und Bestimmung männlicher Reproduktionsparameter

Spermien werden in den Hodenkanälchen gebildet und wandern von dort in den Nebenhoden, wo sie im caudalen Abschnitt bis zur Ejakulation gespeichert werden (Cheng et al., 2010; de Kretser et al., 1998). Für alle hier zusammengefassten funktionellen Untersuchungen an Spermien und die quantitative Bestimmung der Spermienanzahl wurden Spermien aus der *cauda epididymis* von mindestens 10 Wochen alten Männchen verwendet.

Die mit Isofluran betäubte und durch einen Genickbruch getötete, männliche Maus wurde gewogen, um das Körpergewicht als biometrisches Merkmal zu bestimmen. Danach wurde der Bauchraum unverzüglich eröffnet und der caudale Abschnitt beider Nebenhoden sowie circa 1 cm der Samenleiter entnommen und in eine Petrischale mit 37 °C-warmen HS-Puffer überführt. Dort wurde das Gewebe von Fett-, Fremdgewebe- und Blutresten befreit und in eine weitere, mit 2 ml 37 °C-warmen HS-Puffer gefüllte Petrischale transferiert. Der Nebenhoden und der Samenleiter wurden mit einem Skalpell mehrfach eingeschnitten, so dass die Spermien in

das sie umgebende, flüssige Medium schwimmen konnten. Die Petrischale wurde für diesen Vorgang mindestens 30 min in einen 37 °C Wärmeschrank gestellt. Anschließend wurde die Spermiesuspension, möglichst frei von epididymalen Geweberesten, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Spermien vor äußerem Stress, wie Scherkräften oder Erschütterungen zu schützen, wurden diese ausschließlich mit abgeschnittenen Pipettenspitzen äußerst vorsichtig pipettiert und ruckartige Bewegungen vermieden. Zur Bestimmung der Spermienanzahl wurde eine 1:40 Verdünnung in ddH₂O angesetzt und die Zellzahl pro Milliliter (ml) mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Da zu Beginn der Prozedur beide Nebenhoden in 2 ml Puffer eingeschnitten wurden, wurde die mit der Zählkammer bestimmte Spermienanzahl mit dem Faktor zwei multipliziert, um die Gesamtspermienanzahl eines Männchens zu ermitteln. Um einen möglichen Effekt der Gendelektion auf das männliche Reproduktionssystem genauer zu analysieren wurde das Hodengewicht ermittelt, indem beide Hoden eines Männchens direkt nach deren Entnahme gewogen wurden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass keinerlei Fett, oder andere Gewebereste das Resultat der Hodengewichtsbestimmung verfälschten.

3.2.4 Gewinnung von Serum und Plasma aus Blutproben der Maus

Das Blut eines Säugers besteht aus dem zellulären (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) und dem flüssigen Bestandteil, dem Blutplasma (Blutserum mit Gerinnungsfaktoren). Das Blutplasma bzw. Blutserum wird vom Körper als Transportmittel für Hormone verwendet, so dass in diesem die Konzentration unterschiedlicher Hormone im Körper bestimmt werden kann. Im Rahmen dieser hier vorgestellten Studien wurden zu Beginn Serumproben von entnommenem Blut gewonnen, wohingegen im Verlauf der Arbeit mit Blutplasma gearbeitet wurde, da sich dieses für die massenspektrometrische Testosteronbestimmung als geeigneter erwies. Für die Blutgewinnung wurde einer mit Isofluran betäubten und durch Genickbruch getöteten Maus mit einer Kanüle (23 G) rasch Vollblut aus der rechten Herzkammer entnommen.

Als Blutserum (kurz: Serum) wird der flüssige, klare Überstand bezeichnet, der sich *in vitro* nach abgeschlossener Blutgerinnung vom Koagulum absetzt. Das Serum ist im Gegensatz zum Blutplasma frei von Fibrinogenen. Eine Serumprobe vom Blut einer Maus wurde gewonnen, indem die Koagulation des Blutes in einem Reaktionsgefäß erlaubt wurde und nach 30 min eine vollständige Gerinnung festgestellt werden konnte. Durch eine Zentrifugation des geronnenen Blutes für 10 min bei 4.500 g setzten sich die Blutzellen und das Fibrin des Blutes ab und das Serum verblieb im Überstand. Dieses wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Da Blutplasma alle Gerinnungsfaktoren enthält, wurde bei der Blutentnahme das Blut schnell in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-beschichtete Reaktionsgefäße überführt, um eine Koagulation des Blutes zu verhindern. Das Gefäß wurde anschließend zehnmal vorsichtig invertiert und bei 4 °C bis zur zeitnahen Blutfraktionierung aufbewahrt. Die zellulären Bestandteile wurden hierbei durch eine Zentrifugation für 10 min bei 5.000 g und 4 °C von dem flüssigen Blutplasma getrennt, das vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert wurde. Bis zur Verwendung des Blutplasmas wurde dieses bei -80 °C aufbewahrt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Immunhistochemische Untersuchung von murinen Gewebe

Die Expression eines Proteins kann mit zahlreichen Techniken untersucht werden, unter anderem mit der indirekten Markierung im Gewebe durch eine Antikörperreaktion. Das Prinzip beruht auf der Basis der Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der ein Antikörper das zu untersuchende Protein an seinem Antigen-Epitop erkennt und durch eine Komplexbildung mit einem Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörper die Lokalisation des Proteins im Gewebe erkennbar macht. Der Expressionsort kann anschließend an einem Fluoreszenz- oder konfokalen Mikroskop untersucht werden.

3.3.1.1 *Fixierung, Anfertigen und immunhistochemische Untersuchung von Gefrierschnitten*

3.3.1.1.1 Gewebefixierung und Einbetten in Einbettmedium

Das einer Maus entnommene und gesäuberte Organ wurde zügig in 4 % PFA in Natriumphosphatpuffer, pH 7.4, überführt und für 2 Stunden (h) bei 4 °C fixiert. Um ein Platzen der Zellen durch die anschließende Lagerung bei -80 °C zu vermeiden, wurde das fixierte Organ über Nacht bei 4 °C in einem 20-25 % Sucrose/PBS-Puffer inkubiert. Das kryoprotektierte Organ wurde mit Einbettmedium in einem Hütchen aus Aluminiumfolie auf Trockeneis eingebettet und bis zum Schneidevorgang bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.1.1.2 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Gefrierblöcke wurden mit Einbettmedium auf einer Halterung des Cryostaten (CM3050 S, Leica) befestigt und in die Objektfassung eingespannt. Während des Schneidevorgangs betrug die Kammerinnentemperatur -18 °C und die Temperatur des Objekttisches -20 °C. Die Schnittdicke, die vom Gewebetyp abhängig war, lag zwischen 6 und 15 µm und ist für jedes Versuchsvorhaben im Ergebnisteil genau angegeben. Die, durch eine rotierende Bewegung der Klinge, erzeugten Gewebeschnitte wurden auf beschichtete Objektträger aufgezogen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.1.1.3 Immunhistochemische Markierung

Während der Arbeit mit Gewebe, das ein Fluoreszenzprotein exprimierte, wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Durchführung der Methode unter Ausschluss von Licht erfolgte. Zur immunhistochemischen Markierung wurden Gefrierschnitte 10-15 min bei RT angetaut und 30 min mit einer Blockierungs- und Permeabilisierungslösung (10 % FCS in 0,3 Triton X-100/PBS) in einer feuchten Kammer bei 4 °C behandelt. Indem unspezifische Bindestellen gesättigt wurden, führte die Blockierung zu einer spezifischeren Bindung des Antikörpers an das Epitop. Der Antikörper wurde in 5 % FCS in 0,3 % Triton X-100/PBS verdünnt, auf den Gewebeschnitt aufgebracht und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Der überschüssige, nicht-gebundene Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen von je 10 min in einer Glasküvette mit 1x PBS entfernt. Der Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper, der das speziesspezifische Fc-Fragment des Erstantikörpers erkennt, wurde ebenfalls in frisch angesetzter 5 % FCS in 0,3 % Triton X-100/PBS-Lösung verdünnt und 2 h bei RT in einer feuchten, lichtundurchlässigen Kammer auf dem Gewebeschnitt belassen. Für die Darstellung von Zellkernen mit TO-PRO-3 (1:1.000) oder DAPI (1:10) wurde der Zweitantikörperlösung der Farbstoff in der entsprechenden Verdünnung zugefügt. Erneut wurde überflüssiger Antikörper durch drei Waschgänge von je 10 min mit 1x PBS entfernt und der Schnitt auf dem Objektträger mit Mounting-Medium und einem Deckglas eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Die

Untersuchung der Fluoreszenzmarkierung fand an einem konfokalen Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss) der Zahnklinik der LMU München statt. Hierbei wurde zuerst ein Präparat, welches ausschließlich mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurde (Negativkontrolle) untersucht, um die unspezifische Bindung des Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpers und das dadurch entstehende Signal festzustellen. Die hierbei verwendeten Laser-Einstellungen wurden derart justiert, dass ein Hintergrundsignal äußerst gering zu detektieren war. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass alle anschließend mit den gleichen Laser-Einstellungen aufgenommenen Fluoreszenzsignale keine falsch-positiven Ergebnisse darstellten.

3.3.1.2 *Fixierung, Anfertigung und immunhistochemische Untersuchung von Paraffinschnitten*

3.3.1.2.1 Gewebefixierung und Einbetten in Paraffin

Für die immunhistochemische Untersuchung von Paraffinschnitten wurden die Organe in warmes, flüssiges Paraffin, welches bei RT aushärtet, eingebettet. Hierfür wurden die zu untersuchenden Organe aus dem getöteten Tier entnommen und mit 1x PBS von Blut- und Fellresten gesäubert. Direkt nach der Entnahme wurden die Organe in 10 % gepufferter Formalinlösung (3,7 % Formaldehyd in PBS) über Nacht bei 4 °C fixiert, um autolytische Prozesse und eine mikrobiologische Degradation zu vermeiden. Für das Einbetten in Paraffin, welches nicht mit Wasser mischbar ist, wurde das Organ zuvor entwässert. Hierfür wurde eine aufsteigende Ethanolreihe (je zweimal 70 %, 80 %, 90 %, 100 %) verwendet, der sich ein zweimaliges Bad in Xylol anschloss, welches eine organisch-chemische Flüssigkeit ist, die sich sowohl mit Alkohol, als auch mit Paraffin mischen lässt. Jeder dieser einzelnen Inkubationsschritte dauerte 1 h. Im Anschluss erfolgte die Inkubation des Gewebes in erwärmten, flüssigen Paraffin, wodurch es zu einer Infiltration des Gewebes durch flüssiges Wachs kam. Nach dem Durchtränken wurde das Organ in einer Einbettkassette mit flüssigem Paraffin eingebettet und bis zur vollständigen Erhärtung auf einer Kälteplatte belassen. Die dauerhafte Lagerung dieser Paraffinblöcke erfolgte bei 4 °C. Die Vorgänge der entwässernden, aufsteigenden Alkoholreihe und des Einbettens in Paraffin wurden am Institut für Rechtsmedizin der LMU mit einem Gewebeinfiltrationsautomaten und einer Einbettstation durchgeführt.

3.3.1.2.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Mithilfe eines Rotationsmikrotoms wurden von den angefertigten Paraffinblöcken 3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden anschließend in ein 45 °C warmes Wasserbad überführt, wodurch die, durch das Schneiden entstandenen, Falten geglättet wurden. Die Gewebeschnitte wurden auf beschichtete Objektträger aufgezogen und aufrecht für 2 h bei 80 °C erwärmt, damit überschüssiges Paraffin abfließen konnte. Entparaffinierte Gewebeschnitte wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.3.1.2.3 Immunhistochemische Markierung

Eine Antigen-Antikörper-Reaktion findet im wässrigen Milieu statt, weswegen Paraffinschnitte, welche zuvor vollständig entwässert wurden (siehe 3.3.1.2.1), wieder rehydriert werden mussten. Hierfür erfolgte eine zweimalige Inkubation in Xylol (je 10 min) und eine absteigende Ethanolreihe (100 %, 100 %, 80 %, 70 %; jeweils 5 min), sowie eine abschließende Inkubation in ddH₂O. Durch die vorangegangene Formalin-Fixierung kann es zu einer Proteinquervernetzung kommen, wodurch Epitope „maskiert“ werden. Dies wurde durch eine sogenannte „Demaskierung“ (*Antigen-Retrieval*) rückgängig gemacht. Hierfür wurde der Gewebeschnitt nach der Rehydrierung in kochenden Citratpuffer überführt und 10 min in der Mikrowelle gekocht.

Nach einer Abkühlphase von 30 min bei RT wurde für den Antikörper-basierten Nachweis eines Proteins mit den Paraffinschnitten ebenso verfahren, wie für die Gefrierschnitte bereits erläutert wurde (siehe 3.3.1.1.3). Zunächst erfolgte eine Blockierung unspezifischer Proteinbindestellen (10 % FCS in 0,3 Triton X-100/PBS), und die Inkubation mit einem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Der überschüssige und ungebundene Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen von je 10 min mit 1x PBS entfernt, und die Sekundärantikörperlösung, die direkt mit einem Kernfarbstoff versetzt wurde, für 2 h bei RT und unter Ausschluss von Licht auf den Gewebeschnitt gegeben. Durch erneutes Waschen mit 1x PBS wurde ungebundener Antikörper entfernt und der Gewebeschnitt abschließend mit Mounting-Medium und einem Deckglas eingedeckelt. Die Detektion der Fluoreszenzmoleküle fand an einem konfokalen Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss) der Zahnklinik der LMU München statt. Zu Beginn der mikroskopischen Analysen wurde die Negativkontrolle untersucht und die Laser-Einstellungen derart gewählt, dass kein Hintergrundsignal durch unspezifische Bindungen des fluoreszierenden Zweitantikörpers zu detektieren war. Diese Einstellungen wurden für die weiteren Aufnahmen nicht verändert und auf diese Weise die Aufnahme falsch-positiver Signale verhindert.

3.3.1.3 Immunzytochemische Untersuchung von Spermien

3.3.1.3.1 Anfertigung von Spermienausstrichen für die Mikroskopie

Für immunzytochemische Färbungen an isolierten Spermien wurde der caudale Abschnitt des Nebenhodens entnommen, in HS-Puffer gewaschen, um Blut-, Fell- und Fettreste zu entfernen und in eine Petrischale mit 2 ml vorgewärmten HS-Puffer überführt. Das Gewebe wurde mehrere Male mit einem Skalpell eingeschnitten. In einem 37 °C Wärmeschrank konnten die Spermien für mindestens 15 min in das sie umgebende Medium schwimmen. Die Spermiesuspension wurde anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 400 g zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde zweimal in 1x PBS gewaschen und pro Nebenhoden in 250 µl 1x PBS aufgenommen. Ungefähr 20 µl dieser Spermiesuspension wurden innerhalb eines Fettkreises auf einem Objektträger ausgestrichen und bei RT getrocknet. Eine Proteindegradation wurde vermieden indem die Präparate anschließend für 5 min in 1x PBS rehydriert und mit eiskaltem Methanol 2 min bei -20°C fixiert und permeabilisiert wurden. Die Präparate wurden nach der Fixierung in 1x PBS gewaschen und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.3.1.3.2 Immunzytochemische Markierung

Unspezifische Antigen-Antikörper-Bindungen in Spermien von zuvor angefertigten Ausstrichen (siehe 3.3.1.3.1) wurden durch eine 30 min Inkubation in einer feuchten Kammer mit einer Blockierungslösung (10 % FCS in 1x PBS) bei RT vermieden. Der Primärantikörper wurde in 5 % FCS in 1x PBS verdünnt und die Lösung auf die Spermienausstriche aufgebracht, so dass über Nacht in einer dunklen, feuchten Kammer bei 4 °C eine Antikörperreaktion stattfinden konnte. Der ungebundene Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen von je 10 min mit 1x PBS entfernt, und der Sekundärantikörper für 2 h bei RT in einer feuchten Kammer auf den Zellen inkubiert. Der Fluorochrom-gekoppelte Zweitantikörper wurde in der gleichen, frisch angesetzten Lösung wie der Erstantikörper verdünnt. Für die Visualisierung der Zellkerne wurden der Zweitantikörperlösung entweder der Farbstoff TO-PRO-3 (1:1.000) oder DAPI (1:10) zugegeben. Der überschüssige Antikörper und ungebundener Farbstoff wurden durch drei Waschschriffe von je 10 min mit 1x PBS entfernt und die Präparate mit Mounting-Medium

eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Die Detektion der Fluoreszenzproteine fand an einem konfokalen Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss) der Zahnklinik der LMU München statt.

3.3.1.3.3 Akrosomale Markierung mit *Peanut agglutinin*

Dem Spermienkopf sitzt ein Vesikel auf, welches mit hydrolytischen Enzymen gefüllt ist und als Akrosom bezeichnet wird. Dieses kann mit einem spezifischen Marker, *peanut agglutinin* (PNA), angefärbt werden, wodurch bei der Maus eine sichelförmige Markierung im Spermienkopf sichtbar gemacht werden kann (Aviles et al., 1997). In dieser Arbeit wurden Fluoreszenzgekoppelte Lectine verwendet, an die entweder das Fluorochrom FITC (grün, PNA-FITC) oder TRITC (rot, PNA-TRITC) gekoppelt war. Für die Anwendung des Fluorochrom-gekoppelten PNAs, wurden die Spermien, wie in den Abschnitten 3.3.1.3.1 und 3.3.1.3.2 beschrieben, behandelt und das fluoreszierende PNA (1:500) der Zweitantikörperlösung zugegeben. Die mikroskopische Analyse dieser Markierung erfolgte an einem konfokalen Mikroskop (LSM Meta 510, Zeiss) der Zahnklinik der LMU München.

3.3.2 Gewebefraktionierung

Der Expressionsort eines Proteins innerhalb der Zelle kann Hinweise auf die mögliche Funktion des Proteins geben. Die Methode der fraktionellen Zentrifugation erlaubt es die Lokalisation eines Proteins, aufgrund unterschiedlicher Größen und Dichten der einzelnen Zellbestandteile, bestimmten Fraktionen zuzuordnen (Lottspeich, 2006; McKeel and Jarett, 1970). Der differentiellen Zentrifugation schließt sich eine SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) mit anschließender Western Blot Analyse an.

Zu Beginn wurde das Gewebe, das entweder frisch präpariert, oder bei -80 °C gelagert und zur Aufbereitung kurz vorher aufgetaut wurde, gewogen und pro Gramm Gewebe mit 10 ml Sucrosepuffer, versetzt mit *cOmplete* Proteaseinhibitor, überführt. Die Zerkleinerung und der Zellaufschluss fanden auf Eis in einem Homogenisator mit einem Glaspistill statt. Das Homogenisat wurde in ein entsprechendes Reaktionsgefäß transferiert und 3x 30 Sekunden (sek) mittels eines Ultraschallstabs sonifiziert. Durch die hochfrequenten Ultraschallwellen wurden die Zellen, die durch die mechanische Einwirkung noch nicht aufgeschlossen waren, aufgebrochen. Der erste Zentrifugationsschritt für 10 min bei 2.000 g und 4 °C führte zur Präzipitierung der schweren Zellkomponenten, wie den Zellkernen und dem Zytoskelett. Dieses Pellet wurde verworfen, und der Überstand (= S1), der die Zellmembranen und die membranassoziierten Proteine enthielt, für die weitere Fraktionierung verwendet. Nachdem ein Aliquot des S1-Überstands für anschließende proteinbiochemische Untersuchungen abgenommen wurde, wurde der Restüberstand erneut für 1 h bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Im Überstand (= S2) befanden sich die zytosolischen und membranassoziierten Proteine, wohingegen sich die Zellmembranen im Pellet (= P2) absetzten, das in ddH₂O gelöst wurde. Es wurde von allen Fraktionen (S1, S2, P2) die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 3.3.3) und derart mit ddH₂O verdünnt und mit SDS-Ladepuffer versetzt, dass sich eine finale Proteinkonzentration von 2 mg/ml ergab. Auf diese Weise konnten die vorbereiteten Proben auf die Verteilung eines Proteins innerhalb der Zelle hin mit Hilfe der Western Blot Methode (siehe 3.3.4.2) untersucht werden.

3.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung des Proteingehalts einer Probe verhindert falsch-negative Ergebnisse bezüglich der Proteinexpression. Der Bradford-Test wird mit dem Farbstoff Coomassie-Brillant Blau durchgeführt, der in saurer Lösung Proteine bindet, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm verschiebt, das dann mit Hilfe eines Photometers gemessen werden kann (Bradford, 1976).

Für die Proteinbestimmung wurden 2 µl Probe mit 98 µl ddH₂O und 1,5 ml Bradford-Reagenz vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung konnte nur in Abhängigkeit von einer Standardprobe stattfinden, welche sich aus 2 µl BSA (2 mg/ml), 2 µl des für die Probe verwendeten Puffers, 96 µl ddH₂O und 1,5 ml Bradford-Reagenz zusammensetzte. Um die Reaktivität des verwendeten Puffers in der Auswertung vernachlässigen zu können, wurde eine Leerprobe, die aus 2 µl des Puffers, 98 µl ddH₂O und 1,5 ml Bradford-Reagenz bestand, angesetzt. Sowohl diese Probe als auch die Standardprobe wurden für 5 min bei RT inkubiert, bevor zuerst die Leerprobe und dann der Standard und die Versuchsproben in einer Halbmikroküvette in einem Photometer bei 595 nm gemessen wurden. Die hierbei ermittelten Werte wurden zu den Werten der Standardprobe ins Verhältnis gesetzt und dadurch eine quantitative Ermittlung ermöglicht. Bis auf die Leerprobe, wurden alle Proben in Triplikaten angesetzt und gemessen. Mit Hilfe dieser Konzentrationsbestimmung war es möglich gleich viel Proteinmenge auf ein SDS-Gel aufzutragen und so Expressionsraten eines Proteins in unterschiedlichen Proben miteinander zu vergleichen.

3.3.4 SDS-PAGE – Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Der Nachweis eines Proteins kann über die Molekülmassenauftrennung durch eine SDS-PAGE und der Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mit anschließendem Immunnachweis erfolgen. Hierbei wird die aufzutrennende Probe mit einem Ladepuffer versetzt, der die Detergenzien Natriumdodecylsulfat (SDS) & β-Mercaptoethanol enthält. Durch die Anlagerung des SDS an die Proteine und das zusätzliche Aufkochen der Probe, wodurch eine Denaturierung der Proteine erfolgt, können die enthaltenen Proteine linearisiert werden. Die so vorbereiteten Proben durchwandern anschließend die Gelmatrix eines diskontinuierlichen SDS-Gels, wodurch es zu einer massenabhängigen Auftrennung der Proteine kommt, da schwerere und somit längere Proteine von dem Gel stärker zurückgehalten werden und dadurch eine langsamere Laufgeschwindigkeit haben, als leichtere, kürzere Proteine. Im Anschluss an die Proteinauftrennung können die Proteine über einen elektrischen Transfer (Western Blot-Verfahren) aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Die auf der Membran befindlichen Proteine können dann über eine indirekte Immunreaktion markiert und beispielsweise über ein Verfahren mit Chemilumineszenz detektiert werden.

3.3.4.1 SDS-Gel

Für die Proteinauftrennung wurde ein diskontinuierliches SDS-Gel angefertigt, das sich aus einem unteren Trenngel und einem oberen Sammelgel zusammensetzte (Laemmli, 1970). Das Trenngel war variabel in seiner Acrylamidkonzentration (6 – 12 %; Acrylamid / Bisacrylamid 37,5:1), hatte einen pH von 6,8 und eine Ionenkonzentration von 0,5 M Tris/HCl, wohingegen das Sammelgel immer aus 5 % Acrylamid bestand, sowie einen pH von 8,8 und eine

Ionenkonzentration von 1,5 M Tris/HCl aufwies. Von der Molekülmasse des nachzuweisenden Proteins wurde der prozentuale Gehalt des Acrylamids im Trenngel abhängig gemacht. Kleinere Moleküle, die schneller durch das Gel wandern und für die ein dichteres Gel eine bessere Auftrennung sicherstellt, wurden in hochprozentigen Acrylamid-Gelen aufgetrennt, wohingegen für größere Proteine ein weniger stark vernetztes Gel verwendet wurde. Kurz vor dem Gießen des Gels, wurde die Trenngel-Lösung mit 30 µg/ml Ammoniumpersulfat (APS), einem Polymerisationsinitiator und 0,06 % Temed, ein Polymerisationskatalysator, versetzt, wodurch es rasch zu einer Polymerisation des Gels bzw. des Quervernetzers Acrylamid kam. Um einen glatten Abschluss des Gels und somit einen guten Übergang zum darauffolgenden Sammelgel zu ermöglichen, wurde das noch flüssige Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Dieses wurde nach der Auspolymerisation entfernt und die mit Temed und APS versetzte Sammelgel-Lösung auf das ausgehärtete Trenngel gegossen. Nach dem Gießen und vor dem Aushärten des Gels wurde das Sammelgel direkt mit einem Probenkamm versehen, welcher Taschen in das später polymerisierte Gel formte, in die die Versuchsproben geladen werden konnten. Die Proben wurden mit einem vierfach konzentrierten SDS-Ladepuffer versehen und dreimal je 30 sek sonifiziert. Durch die denaturierenden Komponenten des Ladepuffers und der Sonifizierung sowie dem anschließenden Aufkochen der Probe bei 95 °C für 5 min wurde ein guter Zellaufschluss, aber auch die Zerstörung genomischer DNA gewährleistet. Die Proben wurden, neben einem Proteingrößenmarker, auf das diskontinuierliche SDS-Gel aufgetragen, das sich in einer mit 1x Laufpuffer befüllten Laufkammer befand. Um alle Proben in einer Laufront zu sammeln, wurde zu Beginn an die Laufkammer eine Spannung von 80 V angelegt, bei der das Proteingemisch durch das Sammelgel laufen konnte. Anschließend wurde das Spannungsfeld auf 120 V erhöht und die Proben im Trenngel massenabhängig aufgetrennt.

3.3.4.2 Western Blot

In der Biochemie ist die Methode des Western Blots eine sehr gängige Möglichkeit um Proteine, die in einem SDS-Gel aufgetrennt wurden (siehe 3.3.4.1) auf eine Membran zu übertragen, die dann über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden können (Towbin et al., 1979).

Sobald die Proteine im SDS-Gel ausreichend aufgetrennt waren, wurde das Gel in eine Semi-Dry Western Blot Kammer überführt, wo es auf eine Nitrozellulosemembran gelegt wurde, welche eine hohe Proteinbindekapazität aufweist und Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen binden kann. Um diese Bindestellen zu aktivieren, wurden sowohl die Membran, als auch die Filterpapiere in Blotpuffer getränkt, der Methanol enthielt. Der Aufbau eines „Blotstapels“ sah wie folgt aus: Auf die Anode der Kammer wurden sechs Filterpapiere, die in Anodenpuffer I getränkt wurden gelegt. Dieser Stapel wurde mit drei Filterpapieren, sowie einer Nitrozellulosemembran, die zusammen mit dem Anodenpuffer II befeuchtet wurden, weitergeführt. Das SDS-Gel wurde daraufhin luftblasenfrei auf die Membran gelegt und mit sechs Filterpapieren, die mit Kathodenpuffer durchnässt waren, überschichtet. Mit einer kleinen Walze wurden Luft einschlüsse entfernt und die Blotkammer verschlossen. Für den Elektrotransfer der Proteine auf die Membran wurde ein elektrisches Feld senkrecht zum Gel angelegt, wodurch die Proteine Richtung Anode, zur Membran, wanderten. Pro Blotstapel wurde eine Stromstärke von 0.8 mA/cm² Strom angelegt. Je nachdem wie groß das zu übertragende Protein war, wurde eine Übertragungszeit von 30-180 min gewählt.

3.3.4.3 Proteinfärbung mit Ponceau S

Zur Überprüfung eines erfolgreichen Proteintransfers auf eine Nitrozellulosemembran, wurde eine Ponceau S Färbung an den Vorgang des Western Blots angeschlossen. Bei Ponceau S handelt sich um einen rötlichen Farbstoff, der Proteine auf der Membran reversibel anfärben kann, indem er an die positiv geladenen Aminogruppen bindet (Rice and Hammer, 1969).

Die Membran wurde bei RT ungefähr 5 min mit einer Ponceau S Lösung inkubiert und das Übertragungsergebnis festgehalten. Der Farbstoff konnte über mehrere kurze Waschschrte mit Leitungswasser ausgewaschen werden.

3.3.4.4 Immunfärbung

Für die Feststellung, ob das Protein von Interesse in der verwendeten Probe enthalten war, wurde in der vorliegenden Arbeit die indirekte Immuno-Färbemethode angewendet. Zu Beginn wurden, ähnlich dem immunhisto- und immunzytochemischen Verfahren (siehe 3.3.1.1.3), die unspezifischen Proteinbindestellen mit 5 % Magermilchpulver (in TBST) für 30 min abgesättigt. Der Erstantikörper wurde in 3 % Magermilchpulver (in TBST) verdünnt und die Membran über Nacht auf einer Wippe bei 4 °C mit diesem inkubiert. Am nächsten Tag wurde der ungebundene Antikörper durch drei Waschschrte mit TBST von je 10 min entfernt. Der Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelte Zweitantikörper, der den F_c-Teil des Erstantikörpers bindet, wurde anhand der Spezies, aus der der Erstantikörper gewonnen wurde, ausgewählt, und in 3 % Magermilchpulver (in TBST) verdünnt (1:7.500). Nach einer einstündigen Inkubation des Zweitantikörpers auf der Nitrozellulosemembran bei RT und drei Waschschrten mit TBST von je 10 min, wurde aus zwei ECL-Lösungen (Substrat) eine 1:1 Mischung erstellt und diese gleichmäßig auf der Membran verteilt. Eine Inkubationszeit von 1 min löste eine Enzym-Substrat-Reaktion aus, bei der die Peroxidase mit H₂O₂ als Oxidationsmittel das Substrat umsetzte und eine detektierbare Chemilumineszenz entstand. Die überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt und die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Mit dem Programm *Chemicapt* und dem Chemilumineszenz-Detektionssystem „Chemismart“ wurde eine Belichtungszeit zur Detektion der Chemilumineszenz ausgewählt. Anhand der entstandenen Aufnahme und dem parallel aufgetragenen Größenstandard konnte festgestellt werden, ob das Protein in der Probe nachweisbar war. Alle Western Blot Membranen wurden anschließend in Folie eingeschweißt, um ein eventuelles „Re-probing“ zu ermöglichen.

3.3.4.5 Membrane-Stripping und Re-probing

Eine bereits mit Antikörper versehene und entwickelte Western Blot Membran kann erneut mit einem anderen Antikörper markiert (*Re-probing*) und entwickelt werden. Für diesen Schritt ist es notwendig, den gebundenen Antikörper und mögliche Nachweisreagenzien mit einem Puffer, der β-Mercaptoethanol enthält, von der Membran zu lösen (*Membrane-Stripping*). Hierfür wurde die Membran durch eine Inkubation von 10 min in 1x TBST reaktiviert, um dann für 45 min bei 65 °C in Stripping-Puffer zu inkubieren. Anschließend wurde die Membran dreimal jeweils 10 min in 1x TBST gewaschen und mit dem normalen Immunfärbungsprotokoll für Western Blot Membranen (siehe 3.3.4.4) fortgefahren.

3.4 Reproduktionsbiologische Methoden

3.4.1 Morphologische Untersuchung männlicher Reproduktionsorgane der Maus

Das männliche Reproduktionssystem einer Maus besteht hauptsächlich aus dem Hoden, den Nebenhoden und dem sich daran anschließenden Samenleiter. Im Hoden werden die Spermien gebildet und passiv durch den Nebenhoden bis hin zum *Ductus deferens* geleitet, wo sie bis zur Ejakulation gespeichert werden. Untersuchungen bezüglich des Reproduktionserfolgs schließen morphologische Untersuchungen des Reproduktionssystems ein, da von morphologischen Missbildungen bereits eventuelle Fehlfunktionen abgeleitet werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde sich auf die männlichen Reproduktionsorgane und dabei hauptsächlich auf den Hoden und die einzelne Spermienzelle konzentriert.

3.4.1.1 Analyse der Hodenmorphologie

3.4.1.1.1 HE-Färbung

Der Gewebeaufbau eines Organs wird in der Histologie unter anderem mit dem Hämatoxylin-Eosin Färbeverfahren (HE-Färbung) untersucht. Hämatoxylin, ein natürlicher Inhaltsstoff von Blauholz, der nach einer Oxidationsreaktion und der Zugabe von mehrwertigen Metallkationen seine braunblaue Färbung erlangt, färbt saure bzw. basophile Strukturen, wie Zellkerne und das Endoplasmatische Retikulum, blau. Eosin hingegen ist ein synthetischer Farbstoff, der basische bzw. acidophile Strukturen, wie Zellplasmaproteine, Keratin und Mitochondrien rot anfärbt (Avwioro, 2011; Lillie et al., 1976).

Für die Durchführung dieser Färbemethode wurden die angefertigten Paraffinschnitte gewässert (siehe 3.3.1.2.3), zweimal für je 10 min in Xylol, in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 100 %, 80 %, 70 %; je 5 min) und in ddH₂O inkubiert. Die sauren, basophilen Strukturen in den Gewebeschnitten wurden zuerst durch eine 3-5 min Inkubation in Hämatoxylin nach Mayer angefärbt. Durch ein kurzes Spülen in ddH₂O wurde überschüssige Färbelösung entfernt wodurch die angefärbten Strukturen rötlich-braun erschienen, wobei die Neutralisation des sauren pH-Werts durch ein 15 min „Bläuen“ in Leitungswasser zu der charakteristischen blauen Färbung führte. Die Gewebeschnitte wurden 2 min in ddH₂O gespült und als Nächstes die basischen, acidophilen Strukturen durch eine 3 min Inkubation in Eosin G (0,5 % wässrig; 1 Tropfen Eisessig auf 100 ml Lösung) rot angefärbt. Ein Spülen in Leitungswasser entfernte überschüssige Färbelösung. Für eine dauerhafte Fixierung und Lagerung wurden die gefärbten Gewebeschnitte mit Eukitt, einem Kunstharzlack, eingedeckelt. Hierfür mussten die Schnitte wiederum in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 80 %, 100 %, 100 %; je 5 min) und zwei Inkubationen von je 3 min in Xylol entwässert werden, da das Eindeckmedium nicht mit Wasser mischbar ist. Die entwässerten Gewebeschnitte wurden mit Eukitt und einem Deckglas verschlossen. Die morphologische Untersuchung der HE-gefärbten Gewebeschnitte erfolgte an einem Lichtmikroskop (IX71, Olympus, Hamburg).

3.4.1.1.2 Vermessung und quantitative Bestimmung von Hodentubuli

Ein Hoden ist aus mehreren *Tubuli seminiferi* aufgebaut, in denen die Spermienproduktion stattfindet. Durch die Erfassung der Tubulidurchmesser und der quantitativen Tubuli-Bestimmung und damit der Abschätzung des *Interstitium testis*, können pathomorphologische Veränderungen festgestellt werden.

Zur Bestimmung eines Tubulus-Durchmessers wurden Paraffinschnitte des Hodens angefertigt (siehe 3.3.1.2.2) und zur Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen dem HE-Färbeverfahren unterzogen (siehe 3.4.1.1.1). Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurden Übersichtsaufnahmen von möglichst runden Tubuli angefertigt (Objektiv 40x), und deren Durchmesser mit dem Programm *Cell^A* (Olympus, Hamburg) durch das Setzen eines rechtwinkligen Fadenkreuzes ermittelt. Aus den Längen beider Fadenkreuz-Achsen wurde der Mittelwert berechnet, der als „mittlerer Durchmesser“ bezeichnet wird.

Für die quantitative Bestimmung der Tubulianzahl wurden ebenfalls HE-gefärbte Paraffinschnitte von Hoden lichtmikroskopisch untersucht. Es wurden ausschließlich testikuläre Tubuli ausgezählt, die keine Schnittartefakte aufwiesen.

3.4.1.2 Analyse der Spermienmorphologie

Anhand von Coomassie-gefärbten Spermienausstrichen wurden mit einem Lichtmikroskop (Objektiv 100x Öl) einzelne Zellen aufgenommen und über eine Mikroskop-Software (*Cell^A*, Olympus, Hamburg) morphologisch analysiert. Hierfür wurde ein Spermienkopf hinsichtlich vier unterschiedlicher Parameter vermessen: gerade Kopflänge (I), gerade Akrosomlänge (II), Umfang (III), Fläche (IV).

3.4.1.2.1 Coomassie-Färbung

Um die Morphologie von Spermien mikroskopisch zu untersuchen und intakte Akrosomen anzufärben, wurde in der vorliegenden Arbeit der Triphenylfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau (Coomassie) verwendet. Der Farbstoff bindet Proteine an den basischen Seitenketten der Aminosäuren, wodurch besonders proteinreiche Strukturen im Spermium sichtbar gemacht werden können (Moller et al., 1990).

Für den Färbeprozess wurden 2 min lang mit eiskaltem Methanol fixierte und getrocknete Spermienausstriche (siehe 3.3.1.3.1) bei RT mit etwa 300 µl Coomassie-Färbelösung für 7 min inkubiert. Danach wurde die Färbelösung verworfen und der Objektträger kurz in Leitungswasser geschwenkt und überschüssige Färbelösung entfernt. Anschließend wurden 2-3 Tropfen einer 65 °C warmen Kaisers Glycerin-Gelatine Einschlusslösung aufgetropft, und die Spermienpräparate mit einem Deckglas eingedeckelt. Nach dem Aushärten des Eindeckmediums konnte die Spermienmorphologie bzw. der akrosomale Status der Spermienprobe lichtmikroskopisch (Objektiv 100x Öl) erfasst werden.

3.4.1.3 Quantitative Bestimmung apoptotischer Vorkommnisse in Gewebeschnitten des Hodens

Die Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod einer Zelle, der mit einem charakteristischen Abbau der DNA durch Endonukleasen und der Entstehung von DNA-Fragmenten einhergeht. Die dabei entstehenden, freien 3'OH-Enden apoptotischer Zellen können über eine terminale Desoxyribosyl-Transferase (TdT) erkannt werden, ein Prinzip, das sich die TUNEL-Technik (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*) zunutze macht. Dabei werden durch die TdT rot-fluoreszierende Nukleotide enzymatisch an die freien 3'OH-Enden gehängt (TUNEL-Reaktion). Da vitale Zellen nur sehr wenige freie 3'OH-Enden enthalten, können durch die roten Fluoreszenzsignale apoptotische Ereignisse sichtbar gemacht werden und vitale von apoptotischen Zellen unterschieden werden (Darzynkiewicz et al., 2008).

In dieser Arbeit wurde mit dem *In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red* (Roche, Mannheim) die Apoptoserate an Paraffinschnitten (siehe 3.3.1.2.2) von Formalin-fixierten murinen Hoden

bestimmt. Dafür wurden 3 µm dicke Gewebeschnitte rehydriert, indem sie zweimal je 10 min in Xylol und in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 100 %, 80 %, 70 %; je 5 min) inkubiert wurden. Anschließend wurden die Membranen der Zellen für die TdT durchlässig gemacht, indem die Gewebeschnitte mit einer Permeabilisierungslösung (0,1 % Triton X-100, 0,1 % Natriumcitrat) für 8 min in einer feuchten Kammer inkubiert wurden. Die Gewebepräparate wurden daraufhin zweimal mit 1x PBS gewaschen und die im Kit enthaltene Enzymlösung aufpipettiert. Nach Angaben des Herstellers wurden 50 µl Enzymlösung zu 450 µl Markierungslösung gegeben und kräftig gemixt. Ungefähr ein Zehntel der TUNEL Reaktions-Mixtur (50 µl) reichten für Gewebeschnitte auf einen Objektträger. Die Enzymreaktion fand 1h bei 37 °C in einer feuchten Kammer statt. Anschließend wurde das Gemisch durch zwei 1x PBS-Waschschritte für je 5 min wieder entfernt. Zur optischen Kontrastierung der Zellkerne wurden die Gewebeschnitte mit 0,1 µg/ml einer DAPI-Lösung für 30 min bei RT angefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS entfernt, und die angefertigten Präparate zur Verzögerung des Ausbleichens des Tetramethylrhodamins mit Mounting-Medium eingedeckelt.

Die Identifizierung und Quantifizierung der apoptotischen Zellen erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (IX71, Olympus, Hamburg). Dazu wurden in einem Hodenquerschnitt vier gleichgroße Gewebeausschnitte ausgesucht und die Anzahl der darin befindlichen Hodentubuli bestimmt. Anschließend wurden die durch ein rotes Fluoreszenzsignal leicht erkennbaren apoptotischen Zellen gezählt. Durch diese Vorgehensweise wurde nicht nur die Apoptoserate für alle vier Blickfelder bestimmt, sondern auch die Anzahl apoptotischer Zellen pro Tubulus berechnet. Pro Tier wurden vier Hodenschnitte analysiert, aus deren Einzelwerten das arithmetische Mittel gebildet und als eine Untersuchungsgröße („N“) behandelt wurde. Aus den derart erfassten Hoden-spezifischen Apoptoseraten für ein Männchen wurde mit den Ergebnissen weiterer untersuchter Männchen des gleichen Genotyps der Durchschnitt berechnet und über den statistischen T-Test mit den quantitativen Resultaten anderer Genotyp-Gruppen verglichen.

3.4.1.4 Computergestützte Motilitätsanalyse von Spermien (CASA)

Neben morphologischen Auffälligkeiten im Reproduktionsgewebe, könnte auch eine verminderte Motilität der Spermien auf einen Defekt in der Spermienbildung/Funktionalität hindeuten. Um auch diesen Parameter zu erfassen, wurden computergestützte Spermienanalysen in Kooperation mit Frau Dr. Susan Marschall vom Helmholtz Zentrum in München durchgeführt. Folgende Parameter wurden hierbei bestimmt: Anteil der motilen Zellen (MOT, [%]), Anteil der progressiv motilen Zellen (PROG, [%]), Pfadgeschwindigkeit (*average path velocity*, VAP, [µm/sec]), Progressivgeschwindigkeit (*straight line velocity*, VSL, [µm/sec]), Spurgeschwindigkeit (*curvilinear velocity*, VCL, [µm/sec]), seitliche Kopfauslenkung (*amplitude of lateral head displacement*, [µm]), Schlagfrequenz (*beat cross frequency*, [Hz]), Linearitätsindex (Quotient aus VSL und VAP, *straightness*, STR, [%]) und Linearität (Quotient aus VSL und VCL, *linearity*, LIN, [%]).

Die isolierten caudalen Abschnitte des Nebenhodens wurden in 0,9 % NaCl/H₂O gewaschen und von Fett- und Fellresten befreit. Anschließend wurden die Nebenhodenabschnitte in 500 µl vorgewärmten HTF-Puffer überführt, eingeschnitten und 5 min bei 37 °C inkubiert. Die im Nebenhoden verbliebenen immotilen Spermien wurden durch mechanisches Herausdrücken in

die Suspension der motilen Spermien überführt. Von dieser Spermiesuspension wurden 10 µl entnommen und in 500 µl HTF-Puffer, welcher mit Mineralöl überschichtet war, überführt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Für jede Messung, die mit dem Programm *IVOS Sperm Analyzer* durchgeführt wurde, wurden 10 µl der Spermiesuspension in zwei Messbereiche eines 2x CEL Objektträgers pipettiert. Über einen Monitor wurden fünf Messbereiche ausgewählt, die frei von Geweberesten und Luftblasen waren. Die voll automatisierte Messung erfolgte für 0,5 sek bei 60 Hz. Pro Tier wurden jeweils drei Objektträger mit je zwei Aliquots der Spermien analysiert. Für die Auswertung wurde aus den erhaltenen sechs Messwerten jedes Parameters der Durchschnitt gebildet, der in die Berechnung der Mittelwerte für die Motilitätsanalyse des jeweils untersuchten Genotyps der Mauslinie einging.

3.4.2 Quantitative Untersuchung der *in vitro* ausgelösten Akrosomreaktion

Während der *in vitro* Kapazitierung der Spermien erlangen die männlichen Keimzellen die Fähigkeit zur Durchführung der Akrosomreaktion, die bei der Befruchtung der Eizelle für den enzymatischen Abbau der *Zona pellucida* wichtig ist (de Lamirande et al., 1997; Visconti et al., 2011). Bei einem geringen Anteil der Spermien kommt es während der sekundären Reifungsphase aber auch zu einem spontanen Verlust des Akrosoms, so dass eine spätere Insemination der Eizelle unmöglich ist (Klemm and Engel, 1991; Mortimer et al., 1989; Visconti et al., 1999). Zur Untersuchung der vollständigen Kapazitierung und der dadurch mit einem Ca^{2+} -Ionophor (A23187) möglichen Induzierbarkeit der Akrosomreaktion, wurden Spermien aus caudalen Abschnitten des Nebenhodens transgener Mäuse verwendet und der *in vitro* Kapazitierung unterzogen.

3.4.2.1 *In vitro* Untersuchung der spontanen- und der artifiziell ausgelösten Akrosomreaktion

A23187 ist ein Ca^{2+} -Ionophor, mit dessen Hilfe die maximale, durch Ca^{2+} induzierbare, Akrosomreaktionsrate festgestellt werden kann. Durch die, anhand eines derart starken Stimulus, künstlich hervorgerufenen Akrosomreaktion kann neben der Erfassung des maximal möglichen Akrosomverlusts auch die Überprüfung der notwendigen Exozytosemaschinerie in genmanipulierten Männchen stattfinden.

Für diese Untersuchung wurden frisch entnommene, caudale Nebenhodenabschnitte und ein Teil des Samenleiters in HS-Puffer gewaschen (siehe 3.2.3). Das Gewebe wurde in eine Petrischale mit 2 ml Kapazitierungspuffer überführt und mehrmals mit einem scharfen Skalpell eingeschnitten. Anschließend wurde die Petrischale mit dem eingeschnittenen Gewebe in einen 37 °C Brutschrank mit 5 % CO_2 Sättigung überführt. Um den zeitabhängigen Kapazitierungsstatus zu erfassen, wurden zu den Zeitpunkten 0, 30, 60 und 90 (min) jeweils ein Aliquot (50 µl) der Spermiesuspension abgenommen und alle zellulären Reaktionen mit 500 µl Spermienfixierpuffer abgestoppt. Nach 90 min wurde die verbleibende Spermiesuspension vorsichtig in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Während einer anschließenden Zentrifugation für 5 min bei 400 g, RT, wurde die Spermienanzahl/ml bestimmt. Der Überstand der zentrifugierten Probe wurde vorsichtig abgenommen und verworfen, wohingegen das Pellet in 1 ml HS-Puffer resuspendiert und auf eine Konzentration von $3 \cdot 10^6$ Spermien/ml eingestellt wurde. Von dieser Spermienprobe wurden jeweils 100 µl für einen weiteren Zeitwert ($t = 120$ min), die Stimulation mit dem Ca^{2+} -Ionophor A23187 (100 µM) und die Lösungsmittelkontrolle (DMSO) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der ergänzende Zeitwert

fungierte als Negativkontrolle für die beiden zusätzlich angelegten Stimulationsproben. Die maximal mögliche Akrosomreaktionsrate der Spermien wurde durch die Stimulation mit dem Ca^{2+} -Ionophor A23187 (100 μM ; Endkonzentration 10 μM) ausgelöst und untersucht (Brucker and Lipford, 1995). Um eine Reaktion durch das Lösemittel DMSO, in dem das Ionophor verdünnt war, auszuschließen, wurden die Spermien mit 0,1 % DMSO inkubiert. Alle drei Reaktionsansätze wurden für weitere 30 min in einem 37 °C warmen Wasserbad belassen und anschließend mit 500 μl Fixierungspuffer behandelt. Nach 30 min wurden alle Proben für 1 min bei 16.000 g, RT, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die pelletierten Spermien wurden in 200 μl Post-Fixierungspuffer resuspendiert und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 20-30 μl abgenommen und das Pellet in diesem Volumen resuspendiert und auf einen mit einem Fettkreis versehenen Objektträger ausgestrichen und bei RT getrocknet.

3.4.2.2 Bestimmung des akrosomalen Status

Für die quantitative Bestimmung der Akrosomreaktion wurden die angefertigten Spermienpräparate mit einer Coomassie-Färbelösung behandelt, wodurch proteinreiche Strukturen blau angefärbt wurden (siehe 3.4.1.2.1). Am Lichtmikroskop wurden ungefähr 200 Spermien auf ihren akrosomalen Status hin untersucht, indem überprüft wurde, ob ein Spermienkopf durch eine dunkelblaue Sichelstruktur markiert war.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung des physiologischen Stimulus der *Zona pellucida* auf die Akrosomreaktion untersucht. Für den *in vitro* Vorgang wurden zuvor Eihüllen isoliert und solubilisiert (siehe 3.4.3) (Kirkman-Brown et al., 2002; Liu and Baker, 1996). Zur Stimulierung der Spermien mit isolierter *Zona pellucida* wurden Spermien nach 90 min *in vitro* Kapazitierung mit isolierten Eihüllen bzw. dem Reaktionspuffer, in dem die Eihüllen aufgenommen wurden, für 30 min im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Die Menge der zu stimulierenden Spermien ermittelte sich aus dem Grundsatz, im Überschuss isolierte *Zonae pellucidae* für die Spermienstimulation zu verwenden (zehn *Zonae pellucidae*/ μl Spermien). Nach der Stimulation wurden die Spermien fixiert, auf Objektträgern ausgestrichen, mit einer Coomassie-Färbelösung gefärbt und die prozentuale Akrosomreaktionsrate an einem Lichtmikroskop ausgewertet (siehe 3.4.1.2.1).

3.4.3 Isolierung und Solubilisierung von *Zona pellucida*

Neben der Gewinnung von Eizellen aus den Ovarien, ist es ebenso möglich die Eihüllen, *Zonae pellucidae*, von den Eizellen zu entfernen und aufzureinigen. Hierfür wird eine Dichtegradientenzentrifugation mit einem Percoll-Gradienten angewendet, die es in Zusammenarbeit mit DNasen, Detergenzien, Tensiden und Protease-Inhibitoren ermöglicht die Eihülle möglichst intakt von der Eizelle abzulösen.

Während der Prozedur wurden nur Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwendet, die mit einer Silanverbindung beschichtet wurden, so dass ein Verlust der Eihüllen durch Anheften der *Zonae* vermieden werden konnte. Am Tag vor der *Zona pellucida* Isolierung wurden die Pipettenspitzen durch zweimaliges Aufnehmen von *Sigmacoat* und dem anschließendem Spülen mit ddH₂O beschichtet. Größere Reaktionsgefäße wurden ebenfalls mit *Sigmacoat* benetzt und

anschließend mit ddH₂O gespült. Alle beschichteten Utensilien wurden über Nacht unter Luftabzug getrocknet.

Für den Dichtegradienten wurde Percoll in unterschiedlichen Konzentrationen (2,5 ml 2 %, 2,5 ml 10 %, 3 ml 22 %) mit dem später für die Isolierung eingesetzten Puffer (HB-Puffer) verdünnt. Jeweils 2 ml der 2 % und 10 % Percoll-Verdünnungen wurden vorsichtig auf die 22 % Percoll-Schicht geschichtet, wobei die Percoll-Konzentrationen von unten nach oben im Reaktionsgefäß abnahmen. Der Gradient wurde bis zum Ende der Ovarien-Präparation bei 4 °C gelagert.

Die Ovarien von ungefähr 20, mindestens 5-6 Wochen alten Balb/C-Weibchen wurden präpariert und die isolierten Eierstöcke sofort in eisgekühlten 2 ml HB-Puffer überführt, welcher mit *cOmplete* Proteaseinhibitor, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1 µM Pepstatin, 0,2 mg/ml Aprotinin und 0,2 mg/ml DNase I supplementiert war. Die Gewebesuspension wurde in einen Glashomogenisator überführt und das Gewebe mit einem Glaspistill mechanisch zerkleinert. Ein zusätzlicher Zellaufschluss erfolgte durch die Zugabe von jeweils 10 % Nonidet P-40 (NP-40) und Natrium-Desoxycholat, in HB-Puffer. Das Homogenisat wurde vorsichtig auf den gekühlten Percoll-Gradienten geschichtet, wobei sich die oberste Schicht (2 %) mit den homogenisierten Ovarien vermischte. Die Trennung der Eihüllen von den Eizellen erfolgte durch eine zweistündige Zentrifugation mit einem Ausschwingrotor bei 200 g und 4 °C. Die entstandenen drei Fraktionen wurden in separaten Gefäßen aufgenommen und mit HB-Puffer (ohne Aprotinin und DNase I) auf 35 ml (10 % Fraktion, enthält *Zonae*) bzw. auf 5 ml (2 % und 22 % Fraktion) aufgefüllt. Die Phasen, die keine *Zonae* enthalten sollten (2 % und 22 %) wurden bis zum Ende der Isolierung auf Eis aufbewahrt. Die separierte 10 %-Fraktion wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert, damit sich die darin enthaltenen *Zonae* im Pellet absetzten. Die Überstände wurden bis auf 500 µl abgenommen und verworfen und die Pellets vereinigt. Die leeren Reaktionsgefäße wurden mit 500 µl des Puffers gespült und diese Menge an Flüssigkeit erneut zusammengeführt, um so wenig Material wie möglich zu verlieren. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis ein Reaktionsgefäß mit einem Pellet übrig blieb. Der Überstand dieses Gefäßes wurde bis auf 100 µl abgenommen und das Pellet in 1,5 ml HS-Puffer, der mit NaHCO₃ und BSA (siehe 3.4.2.1), sowie einer *cOmplete* Proteaseinhibitortablette und den Proteaseinhibitoren PMSF (100 µl) und Pepstatin (70 µl) (= HS+PI) versetzt wurde, resuspendiert. Von nun an wurde stets eine Leerkontrolle, bestehend dem HS+PI Puffer, mitgeführt. Die Probe und die Leerprobe wurden für 10 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 150 µl HS+PI resuspendiert. Für das spätere Aliquotieren der *Zonae*-Fraktion wurde die Anzahl der in der Probe befindlichen Eihüllen bestimmt. Dafür wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops die *Zonae* in 1 µl Suspension gezählt und auf das Gesamtvolumen der Suspension hochgerechnet. Für die Solubilisierung der Glykoproteine aus den Eihüllen wurde die Probe und die Leerprobe mit konzentrierter 37 % Salzsäure (HCl) (1:154, durch Vorversuche ermittelt) versetzt und dadurch ein pH-Wert von 2,5 eingestellt. Die Probe und Leerprobe wurden 15 min bei 37 °C inkubiert und für 10 min bei 16.000 g, RT, zentrifugiert. Um den pH-Wert des Überstands, in dem sich im Anschluss an die Zentrifugation alle *Zonae* befanden, zu neutralisieren (pH-Wert 7,4), wurde dieser in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 5 M Natronlauge (NaOH) versetzt (1:85, durch Vorversuche ermittelt). Das entstandene *Zona*-Solubilisat und die Leerprobe wurden aliquotiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und für eine längere Lagerung bei

-80 °C aufbewahrt. Zur Bestimmung des Aliquotvolumens wurde beachtet, dass im späteren Verlauf 30 µl Spermien einer 3×10^6 Zellen/ml-Suspension mit 7-10 *Zonae*/µl Spermien stimuliert werden sollten.

3.4.4 Quantitative Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Spermien

3.4.4.1 Beschichtung von Deckgläsern

In dieser Arbeit wurde das basale, intrazelluläre Ca^{2+} -Level in einzelnen, vitalen Spermien bestimmt, welche zuvor auf beschichteten Deckgläsern fixiert wurden.

Für die Beschichtung der Deckgläser wurde Laminin und Poly-L-Ornithin verwendet, die zur verbesserten Adhäsion der Zelle beitragen. Im ersten Schritt wurde Laminin (50 µg/ml) mit 1x PBS verdünnt (1:20) und davon 50 µl in die Mitte eines runden 24 mm Deckgläschens pipettiert. Nach 1 h Inkubation wurde das Deckglas mit ddH₂O gewaschen und getrocknet. Im zweiten Schritt wurden 50 µl 0,01 % Poly-L-Ornithin in ddH₂O auf die exakt gleiche Stelle pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Die Lösung wurde ebenfalls abgesaugt, und das Deckglas mit ddH₂O gewaschen und getrocknet. Bis zur Verwendung wurden die vorbereiteten Deckgläser bei 4 °C gelagert.

3.4.4.2 Beladung von Spermien mit dem Ca^{2+} -Indikator Fura-2AM

Die Methode des Calcium Imagings beruht auf den Fluoreszenzfarbstoff Fura-2, der über Ca^{2+} Chelatkomplexe bildet und als Ca^{2+} -Indikator fungiert. Ein Derivat des Farbstoffs, das mit einem Acetoxymethylester versehen wurde (Fura-2-AM), ist membrangängig und verbleibt nach dem Abspalten des Esters durch endogene Esterasen aktiv in der Zelle, so dass das gemessene Signal überwiegend stabil bleiben kann. Die photometrische Konzentrationsbestimmung des intrazellulären Ca^{2+} erfolgt durch eine ratiometrische Messung der Fluoreszenzänderung der Anregungswellenlängen 340 nm (gebundenes Fura-2) und 380 nm (ungebundenes Fura-2). Die Emission wird bei 510 nm festgehalten und aus den Ratio-Werten das Level der Ca^{2+} -Konzentration ermittelt (Grynkiewicz et al., 1985).

Die Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde an isolierten unkapazitierten bzw. kapazitierten caudalen Spermien vorgenommen, die, wie bereits beschrieben, isoliert wurden (siehe 3.2.3). Nach einer 15 min Inkubation im 37 °C Wärmeschrank (unkapazitierte Spermien) bzw. einer 60 min Inkubation im Zellinkubator bei 37 °C mit 5 % CO₂-Sättigung (kapazitierte Spermien) wurde die Spermien suspension vorsichtig in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml HS-Puffer resuspendiert und erneut bei gleichen Einstellungen zentrifugiert. Das Spermienpellet wurde in 800 µl einer Fura-2AM Lösung (800 µl HS, 8 µl Pluronic und 5 µl Fura-2AM) resuspendiert, die zur optimalen Dispersion des Fluoreszenzindikators mit Pluronic versetzt wurde. Die Zellen wurden für 30 min unter Ausschluss von Licht mit Fura-2AM beladen. Nach drei Zentrifugationsschritten für je 5 min bei 16.000 g wurde das Pellet zuerst in 2 ml HS-Puffer resuspendiert, wohingegen nach den beiden letzten Zentrifugationsschritten das Pellet in jeweils 1 ml HS-Puffer aufgenommen wurde. Nach der letzten Resuspension des Spermien-Pellets schlossen sich eine 20 min *Swim-up*- und *Recovery* Phase an, in der sich die vitalen Spermien von

den toten, absinkenden Spermien trennten und durch die eine ausreichende Verseifung des Fura-2-AM Esters gewährleistet wurde.

3.4.4.3 Messung und Auswertung der Ca^{2+} -Konzentration

Für die Messung des intrazellulären Ca^{2+} -Levels wurden 20 μl der Spermiesuspension in die Mitte eines beschichteten Deckglases (siehe 3.4.4.1) pipettiert und 1 min inkubiert, so dass sich die Spermien anheften konnten. Nicht angeheftete Zellen wurden durch zweimaliges Waschen mit jeweils 600 μl HS-Puffer entfernt. Das Deckglas wurde für die Messung in eine Messkammer eingespannt, so dass ein Umspülen der Spermien mit 600 μl HS-Puffer möglich war und Stimulationssubstanzen in Lösung verabreicht werden konnten. An einem Fluoreszenzmikroskop (IX70, Objektiv 63x-Öl, Olympus, Hamburg) wurde mit einer Anregungswellenlänge von 360 nm ein Ausschnitt mit möglichst vitalen und gut beladenen Spermien gesucht. Mit Hilfe des Programms *TillVision* (Tillphotonics) konnte eine Übersicht aufgenommen werden auf der um jeden Spermienkopf, inklusive einer leeren Region (Hintergrund-Messung) eine *region of interest* (ROI) markiert werden konnte, in der die Ca^{2+} -Konzentration gemessen wurde. Im Anschluss wurden die Spermien alternierend 10 ms mit 340 nm bzw. 380 nm angeregt. Nach ungefähr 40 sek wurden vorsichtig 200 μl des Ca^{2+} -Ionophors Ionomycin (15 μM in DMSO) in die Messkammer pipettiert, wodurch anhand eines rapiden und dauerhaften Ca^{2+} -Anstiegs festgestellt werden konnte, ob die zu untersuchenden Zellen noch vital waren (Liu and Hermann, 1978). In der Auswertung wurden die Messwerte der Hintergrund-Messung von den Messwerten der Spermien abgezogen und die basale Ratio aus den ersten zehn Messsekunden gebildet. Es wurden ausschließlich Messungen von Spermien inkludiert, die auf den Ionomycin-basierenden Vitalitätstest mit etwa 50 % intrazellulärem Ca^{2+} -Anstieg reagierten.

3.4.5 Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration in Spermien

Spermien haben keine transkriptionelle Aktivität, weswegen die männlichen Keimzellen auf äußere Stimuli unter anderem mit intrazellulären Veränderungen des sekundären Botenstoff cAMP reagieren können. Mit der Bestimmung des basalen cAMP-Levels und dem Einsatz eines cAMP-modulierenden Aktivators (3-Isobutyl-1-methylxanthin; IBMX; Adenylatzyklasen-Aktivator) und Inhibitors (NaHCO_3^- ; Phosphodiesterasen-Inhibitor) in genmodifizierten Spermien, kann untersucht werden, ob die Signalweiterleitung durch die genetische Manipulation eventuell beeinträchtigt und dadurch die Fruchtbarkeit des Tieres verändert sein könnte.

3.4.5.1 Stimulation von isolierten Spermien

Zur Untersuchung der cAMP-Konzentration in Spermien, wurden vier verschiedene Stimulantien vorbereitet: 1 mM IBMX, 50 mM NaHCO_3^- , 1mM IBMX + 50 mM NaHCO_3^- und reiner HS-Puffer, in dem die Reagenzien gelöst wurden. Jeweils 100 μl dieser Stimulantien wurden in einzelne Reaktionsgefäße vorgelegt und bei 37 °C vorgewärmt.

Einer durch einen Genickbruch getöteten Maus wurden beide caudalen Abschnitte der Nebenhoden und je ein Stück der proximalen Samenleiter entnommen. Während ein epididymaler Abschnitt in eine Petrischale mit 2 ml HS-Puffer überführt und mehrmals eingeschnitten wurde (unkapazitierte Spermienprobe), wurde der zweite Nebenhodenschwanz in eine Petrischale mit 2 ml HS+-Puffer überführt und eingeschnitten (kapazitierte Spermienprobe). Die unkapazitierte Spermienprobe wurde 15 min bei 37 °C im Wärmeschrank

inkubiert, so dass die Spermien in das sie umgebende Medium austreten konnten. Die kapazitierte Probe hingegen wurde 60 min in einem 37 °C Inkubator mit 5 % CO₂-Sättigung belassen. Nach 15 min wurde die Spermien suspension der unkapazitierten Spermien vorsichtig in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde über eine zuvor vorbereitete 1:40 Verdünnung der Spermien die Spermienanzahl in der Probe bestimmt. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Spermienpellet in 1 ml HS-Puffer resuspendiert. Hieraus wurden in Bezug auf die zuvor bestimmte Spermienanzahl, 700 µl einer 10*10⁶ Spermien/ml Suspension erstellt, wovon jeweils 100 µl auf die zuvor vorbereiteten Stimulantien pipettiert wurden. Die bei RT durchgeführte Inkubation der Spermien mit den Stimulantien betrug exakt 5 min und wurde durch das Schockgefrieren in flüssigen Stickstoff rapide abgestoppt. Die Spermien der kapazitierten Spermienprobe wurden nach 60 min ebenfalls vorsichtig in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 2 ml HS-Puffer resuspendiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt und der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml HS-Puffer resuspendiert und die Probe wie zuvor zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des letzten Überstands war das BSA aus dem Kapazitierpuffer nahezu vollständig entfernt und das Pellet wurde in 1 ml HS-Puffer aufgenommen. Die Spermienanzahl dieser Probe wurde bestimmt und in 700 µl Gesamtvolumen auf 10*10⁶ Spermien/ml eingestellt. Wie bereits bei der unkapazitierten Spermienprobe, wurden jeweils 100 µl Spermien suspension auf die frisch vorbereiteten und warmgestellten Stimulantien pipettiert und für exakt 5 min gemeinsam inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Überführen in flüssigen Stickstoff beendet und die Proben bis zur Extraktion des cAMPs bei -80 °C gelagert.

3.4.5.2 Chloroform-Extraktion von cAMP

Aus zuvor stimulierten Spermienproben (siehe 3.4.5.1) wurde mit Hilfe einer Chloroform-Extraktion das cAMP isoliert und in eine 96-Mikrotiterplatte aus dem Kit *cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA non-acetylation)* der Firma General Healthcare übertragen. Es handelt sich hierbei um einen kompetitiven Immunoassay, bei dem die mit einem anti-Kaninchen Antikörper beschichtete Platte von einem, nach Angaben des Herstellers zugegebenen anti-cAMP Antikörper gebunden werden kann, an den wiederum extrahiertes cAMP binden kann. Für die exakte Bestimmung der cAMP-Konzentration in den vorbereiteten Proben wird zusätzlich ein Peroxidase-gekoppeltes cAMP-Konjugat hinzupipettiert, das mit dem cAMP aus der Probe um die anti-cAMP Bindestelle konkurriert. Eine anschließende Inkubation mit einem Enzymsubstrat führt zu einer messbaren katalytischen Reaktion, über die Rückschlüsse auf die Konzentration des Botenstoffs in der Probe gezogen werden können.

Für die Konzentrationsbestimmung des *second messengers* cAMP wurden zunächst die Proteine aus den stimulierten und auf Eis aufgetauten Proben (aus 3.4.5.1) mit 100 µl 7 % Perchlorsäure (PCA) gefällt und anschließend für 15 min bei 3.000 g bei 4 °C pelletiert. Vorsichtig wurden in zwei Schritten jeweils 125 µl des Überstands in ein neues, vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und mit 62,5 µl 10 mM EDTA, das alle Enzymreaktionen stoppte, vermischt. Die Extraktion des cAMPs erfolgte mit 338 µl einer 1:1 Chloroform/Trioctylamin-Mischung. Bei Raumtemperatur wurden die Proben dreimal jeweils 10 sek kräftig durchmischt, so dass sich die auftretende Phasentrennung für kurze Zeit aufhob. Durch die anschließende Zentrifugation für 5 min bei 1.500 g, RT, war es möglich zweimal 120 µl von der oberen, wässrigen Phase zu entnehmen und in einem neuen, gekühlten Reaktionsgefäß zu sammeln. Eine erneute

Zentrifugation der so gewonnenen Probe stellte sicher, dass sich die möglicherweise versehentlich mitüberführte organische Phase im Reaktionsgemisch absetzte. Dadurch konnte eine Beladung der Mikrotiterplatte ausschließlich mit der wässrigen Phase, die das gesamte cAMP beinhaltet, erfolgen.

Die Standardproben, anhand derer die Konzentrationen der Versuchsproben ermittelt werden konnten, wurden durch eine Verdünnungsreihe des definierten und dem Kit beiliegenden Standardgemischs hergestellt. Um vergleichende Messbedingungen für die Standardproben und die zu bestimmenden Proben zu erzielen, wurde der Verdünnungspuffer ebenfalls einer Chloroform-Extraktion unterzogen. Es wurden 2 ml HS-Puffer, in dem die Spermien aufgenommen wurden, mit 1 ml 7 % PCA vermischt und davon 2,5 ml mit 625 µl 10 mM EDTA und 3,4 ml Chloroform/Trioctylamin (1:1) vermengt. Wie bei den zu messenden Proben fand eine Phasenmischung durch dreimaliges, kräftiges Mischen von je 10 sek und eine Zentrifugation für 5 min bei 1.500 g, RT, statt. Die obere, wässrige Phase wurde für das Verdünnen des Standards verwendet.

3.4.5.3 Messung und Auswertung der cAMP-Konzentration

Von den vorbereiteten Standardproben und den Versuchsproben wurden jeweils 100 µl in die Schächte der Mikrotiterplatte pipettiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung an den anti-Kaninchen Antikörper wurde auch eine Probe mit dem verwendeten Verdünnungspuffer angesetzt. Hierfür wurden 200 µl dieses Puffers in die entsprechende Vertiefung überführt. Bis auf den Schacht zur Ermittlung der unspezifischen Bindung, wurden alle weiteren Vertiefungen mit 100 µl des verdünnten cAMP-Antiserums überschichtet. Sämtliche Proben, sowie der Standard und die unspezifische Bindungsprobe sind in Duplikaten ausgeführt worden. Die Bindung des extrahierten cAMPs an den anti-cAMP Antikörper erfolgte über 2 h hinweg auf Eis. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden in alle Vertiefungen 50 µl des nach Herstellerangaben verdünnten Peroxidase-gekoppelten cAMPs pipettiert, welches sich an die noch ungebundenen cAMP-Antikörper Bindestellen heften konnte. Erneut erfolgte eine Inkubation von 1 h auf Eis. Durch das anschließende Entleeren der Vertiefungen wurden alle Bindungsreaktionen unterbrochen und zusätzlich jeder Schacht viermal mit dem beigeführten Waschpuffer gewaschen. Für die exakte Bestimmung der enzymatischen Aktivität und dadurch der cAMP-Konzentration, wurden nach dem letzten Waschschrift in jede Vertiefung der Platte 150 µl Enzymsubstrat zugegeben und nach 1 h Inkubation bei RT die optische Dichte bei 630 nm gemessen. Zusätzlich wurde nach der 1. Messung die Reaktion mit 100 µl 1 M Schwefelsäure (H_2SO_4) abgestoppt und erneut die optische Dichte bei 450 nm in einem Fluoreszenzspektrometer gemessen. Die Ermittlung der cAMP Konzentration in der Probe fand indirekt durch die Bestimmung der katalytischen Substratumsetzung, aufgrund der gebundenen cAMP-gekoppelten Peroxidase statt. Je mehr Substrat katalytisch umgesetzt wurde, desto mehr Enzym-gebundenes cAMP konnte zuvor an den anti-cAMP Antikörper binden und desto weniger Bindestellen waren durch das extrahierte, freie cAMP belegt. Die bestimmten Messwerte wurden zu den Werten der optischen Dichte der Standardproben ins Verhältnis gesetzt und dadurch die genaue cAMP-Konzentration in den entsprechenden Proben bestimmt.

3.4.6 Bestimmung des Testosteronspiegels in Serum und Plasma der Maus

Testosteron ist ein Sexualhormon, das in beiden Geschlechtern produziert wird, jedoch im Mann in einer höheren Konzentration vorliegt. Es ist für den männlichen Phänotyp und die Spermienproduktion verantwortlich, so dass Schwankungen der Hormonkonzentration auch Einfluss auf die Reproduktion des Lebewesens haben könnten. Über das Blut gelangt das Steroidhormon an seine Wirkungsorte, weswegen eine Konzentrationsbestimmung des Hormons über das Blutplasma möglich ist. Da die Testosteronsynthese einem circadianen Rhythmus unterliegt und in den Morgenstunden ihr Maximum erreicht, wurde den getöteten Männchen (11-16 Wochen) vormittags Vollblut aus der rechten Herzkammer entnommen und das Serum bzw. Plasma isoliert (siehe 3.2.4).

Für die Bestimmung der Testosteronkonzentration im Serum der Tas2r131-Mäuse, wurde das *Testosterone EIA Kit* (Cayman Chemicals) verwendet. Es handelt sich dabei um einen kompetitiven ELISA (engl.: *enzyme linked immunosorbent assay*), mit einer Maus anti-Kaninchen beschichteten Mikrotiterplatte, die mit einem Testosteron Antiserum, Acetylcholinesterase-(AChE)-konjugierten Testosteron und freien Serum-Testosteron beladen wird. Beide Formen des Testosterons konkurrieren um die Testosteron-Bindestellen des anti-Testosteron Antikörpers. Für die Bestimmung der Testosteron-Konzentration im Serum wurde das Testosteron aus der Probe extrahiert, um mögliche Störungsreaktionen durch Antikörper und vorhandene Proteine zu verhindern. Für die Extraktion wurden 50 µl Serum mit 250 µl Diethylether versetzt und kräftig geschüttelt. Die obere, organische Phase, in der sich das Testosteron befand, wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und die Überstände der organischen Phase vereint. Das organische Lösungsmittel wurde anschließend bei RT in einer Vakuumzentrifuge verdampft, und das Pellet im mitgelieferten Reaktionspuffer resuspendiert. Die Beladung der Mikrotiterplatte erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll. Durch die Zugabe eines AChE-Substrats konnte anhand messbarer Absorptionswerte an einem Fluoreszenzspektrometer und mit Hilfe der erstellten Standardkurve die Menge an gebundenem AChE-konjugiertem Testosteron bzw. freien Testosteron festgestellt werden. Jede Probe wurde in dreifacher Ausführung gemessen und daraus das arithmetische Mittel berechnet.

Zur Bestimmung der Testosteronkonzentration im Plasma der TRPM5-*knockout*-Mäuse wurden pro Maus 50 µl Blutplasma an Frau Dr. Prehn (Arbeitsgruppe Prof. Adamski) aus dem Helmholtz Zentrum-München Oberschleißheim geschickt. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurde mit Methanol/Zinksulfat ausgefällt und anschließend die Konzentration des freien Gesamttestosterons mit Hilfe der LC-MS/MS Methode (*liquid chromatography tandem mass spectrometry*) quantitativ bestimmt.

3.5 Statistik

Für die Auswertung der erhobenen Daten wurde das Programm *Excel 2010* (Microsoft Office) und *Prism 5.0* (Graph Pad) verwendet. Alle Datensätze wurden mit Hilfe des Grubb's Outlier Tests (<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>) auf signifikante Ausreißer hin untersucht und diese aus der statistischen Analyse ausgeschlossen. Sofern nicht anders angegeben, sind in der vorliegenden Arbeit alle Daten als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Vergleichende Untersuchungen von Datensätzen von Geschwisterpaaren, oder gleichgroßen Stichproben einer Gruppe wurden mit Hilfe des zweiseitigen studentischen T-Tests für gepaarte Stichproben durchgeführt. Wurden Daten von unabhängigen Gruppen durchgeführt, wurde der zweiseitige studentische T-Test für unpaarige Stichproben angewendet. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Expression des Tas2r131 im männlichen Reproduktionsgewebe: Studien zur funktionellen Rolle des Bitterrezeptors für die männliche Fertilität

Zahlreiche Publikationen der letzten Dekade zeigen, dass neben den drei Mitgliedern der Tas1-Geschmacksrezeptor-Familie (Iwatsuki et al., 2010; Meyer et al., 2012; Mosinger et al., 2013; Voigt et al., 2012) auch einige Vertreter der mit ca. 30 Subtypen wesentlich umfangreicheren Familie der Tas2-Bitterrezeptoren im männlichen Reproduktionssystem der Maus exprimiert werden (Li and Zhou, 2012; Voigt et al., 2012; Xu et al., 2013).

In einer vorangegangenen Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe wurde von Frau Dr. Dorke Meyer mit Hilfe von umfangreichen PCR-Studien mit Primern für alle Tas2Rs und muriner Hoden cDNA gezeigt, dass die Anzahl der Transkripte für den Bitterrezeptor Tas2r131 im Vergleich zu anderen Tas2Rs besonders hoch ist (Meyer, 2013). Außerdem wurde in hierarchischen Clusteranalysen gezeigt, dass der Tas2r131 gegenüber den anderen Vertretern der Bitterrezeptorfamilie eine isolierte Position einnimmt. Die geringe Homologie zu anderen Bitterrezeptoren und die besonders starke Expression im Hodengewebe machen den Tas2r131 zu einem besonders interessanten Forschungsobjekt, mit dem Ziel seine genaue Funktion für die männliche Reproduktionsfähigkeit zu erfassen. In diesem Zusammenhang sind u. a. die Ergebnisse initialer Zuchtversuche an der noch nicht-kongenigen Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP} Mauslinie zu erwähnen. Geschlechtsspezifische Zuchtansätze mit einem Wildtyp (Tas2r131 [+/-])-Weibchen und einem heterozygoten (Tas2r131 [+/-]) Männchen zeigten dabei eine signifikante Genotypverschiebung unter den Nachkommen. Entgegen der Mendelschen Vererbungslehre, nach der in der F1-Generation je 50 % Tas2r131 [+/-] bzw. Tas2r131 [-/-]-Nachkommen erwartet werden, wurden von Zuchtpaaren mit dieser geschlechtsspezifischen Genotyp-Kombination der Elterntiere signifikant mehr heterozygote Nachkommen gezeugt ([+/-]: 37 % Jungtiere; [-/-]: 63 % Jungtiere; Chi-Test, $p < 0,001$) (Meyer, 2013). In Zuchtpaaren mit einem heterozygoten (Tas2r131 [+/-]) Weibchen und Wildtyp (Tas2r131 [+/-])-Männchen wurde diese unerwartete Genotypverschiebung hingegen nicht beobachtet. Außerdem wurde festgestellt, dass Tas2r131 [-/-]-Männchen der verwendeten noch nicht-kongenigen Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Mauslinie, im Vergleich zu Tas2r131 [+/-]-Männchen mit dem gleichen genetischen Hintergrund eine signifikant erhöhte Anzahl an Spermien im Nebenhoden aufwiesen (Meyer, 2013). Die erhöhte Spermienanzahl in den Tas2r131-defizienten Männchen führte zu der Hypothese, dass in Tas2r131 [+/-]-Männchen die Verteilung der haploiden Spermien (Tas2r131 [+] und Tas2r131 [-]) nicht gleichmäßig ist (50:50), sondern dass der prozentuale Anteil der Keimzellen mit einem Tas2r131-defizienten [-] Allel erhöht sein könnte. Durch eine derart veränderte Häufigkeit der Tas2r131 [-]-Spermien in den heterozygoten Männchen würde die statistische Wahrscheinlichkeit der Befruchtung einer Tas2r131 [+]-Oozyte durch ein Tas2r131 [-]-Spermium zwangsläufig ansteigen, was eine mögliche Erklärung für die beobachtete Genotypverschiebung unter den Nachkommen sein könnte (Meyer, 2013).

Zur Überprüfung dieser Hypothese sind funktionelle, beispielsweise Fluoreszenz-basierte Ca²⁺-Imaging Studien mit einem spezifischen Liganden für den Tas2r131, bei denen aktivierte Spermien quantifiziert werden könnten, allerdings noch nicht möglich, da für diesen Bitterrezeptor noch kein Ligand identifiziert werden konnte (Chandrashekar et al., 2000; Meyerhof et al., 2011; Mombaerts, 2004). Obwohl in der verwendeten Mauslinie die codierende

Sequenz für den Tas2r131 entfernt und durch eine hrGFP-exprimierende Fluoreszenzkassette ersetzt wurde, die unter der Tas2r131-Promotorkontrolle exprimiert wird, ist aufgrund der beschriebenen, äußerst schwachen GFP-Markierung in epididymalen Spermien (Meyer, 2013; Voigt et al., 2012) auch eine FACS-basierte Sortierung und anschließende prozentuale Quantifizierung der beiden Spermienpopulationen heterozygoter Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Männchen nicht möglich.

Ein weiterer alternativer experimenteller Ansatz besteht darin, das Tas2r131-Protein in Tas2r131 [+] Spermien mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers zu markieren und anschließend in quantitativen Analysen zu bestimmen, ob in heterozygoten Tas2r131-Männchen die Population der Tas2r131 [-] Spermien größer ist als die der Tas2r131 [+] Spermien. Da zum Zeitpunkt der Untersuchung jedoch kein funktionierender anti-Tas2r131 Antikörper zur Verfügung stand, wurden in Zusammenarbeit mit der Firma *Synaptic Systems* vier polyklonale Antikörper gegen den Tas2r131 generiert. Der folgende Abschnitt beschreibt die durchgeführten Studien zur Spezifitätsanalyse der produzierten anti-Tas2r131 Antikörper.

4.1.1 Spezifitätsanalyse der generierten Tas2r131-spezifischen polyklonalen Antikörper

Die Familie der Bitterrezeptoren gehört zu der größten Membranproteinfamilie, den GPCRs, die u. a. für die Signaltransduktion gustatorischer und olfaktorischer aber auch hormoneller Stimuli verantwortlich sind (Katritch et al., 2013; Rosenbaum et al., 2009). Bei der Generierung eines Antikörpers, der einen speziellen GPCR-Subtyp erkennt, liegt die Herausforderung u. a. darin, eine für diesen Rezeptor spezifische Peptidsequenz zu finden, die, ungeachtet der großen Diversität der Bindungspartner, keine oder kaum Sequenzhomologien zu anderen Vertretern der untereinander sehr homologen Familie der GPCRs aufweist. Trotz eines einzigartigen Aminosäureabschnittes eines Rezeptors stellen die strukturellen Unterschiede zwischen dem linearen Peptid und dem nativen GPCR mit seiner dreidimensionalen Struktur und möglichen multiplen Glykosylierungen, weitere Schwierigkeiten dar (Gupta et al., 2008; Takeda et al., 2015). Um diese zu minimieren und gleichzeitig eine Kreuzreaktivität des Antikörpers insbesondere mit anderen im Hoden exprimierten Bitterrezeptoren (Xu et al., 2013) zu vermeiden, wurden Peptidsequenzen des N- und C-Terminus des Tas2r131 ausgewählt, da diese Regionen selbst in Rezeptoren des gleichen GPCR-Subtyps sehr divers sind und sich daher gut als Erkennungssequenz für einen Antikörper eignen (Gupta et al., 2008). Aus diesem Grund wurden gemeinsam mit der Firma *Synaptic Systems* zwei für den Tas2r131-spezifische Peptidsequenzen ausgewählt, die im C-Terminus bzw. N-Terminus der Rezeptoraminosäuresequenz liegen. Zwei Kaninchen wurden mit diesen beiden Peptiden immunisiert und später die Spezifität der vier gewonnenen und aufgereinigten Antikörper in immunhistologischen Analysen getestet.

Um die Spezifität eines der vier generierten Tas2r131-Antikörper zu überprüfen, stellt das Zungengewebe einer Tas2r131 [-/-]-hrGFP-Maus das ideale Kontrollgewebe dar, da hier keine endogene Tas2r131-Expression vorliegt, so dass eine Immunreaktion mit einem spezifischen anti-Tas2r131 Antikörper ausbleiben sollte. Zusätzlich dazu kann die Anzahl der anti-Tas2r131 markierten Geschmackszellen in Tas2r131 [+/+]-Gewebe mit der Anzahl hrGFP-fluoreszierender Geschmackszellen in Tas2r131 [-/-]-Gewebe verglichen werden, was noch als zusätzliches Spezifitätskriterium herangezogen werden kann. Daher wurden zuerst immunhistologische

Untersuchungen zur quantitativen Expression des Tas2r131 in unterschiedlichen Geschmackspapillen durchgeführt.

4.1.1.1 *Tas2r131 in unterschiedlichen Geschmackspapillen der Zunge*

Mit Hilfe von Antikörpernachweisen und genveränderten Mauslinien konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass Rezeptoren der Tas1-Familie überwiegend in den Pilzpapillen exprimiert werden, während die Expression von Bitterrezeptoren hauptsächlich in der größeren und mit mehr Typ-II Zellen ausgestatteten Wallpapille beobachtet wurde (Adler et al., 2000; Hoon et al., 1999; Meyer, 2013; Nelson et al., 2002; Voigt et al., 2012).

Um zu verifizieren, wie viele Tas2r131-positive Zellen in einer Geschmacksknospe der drei verschiedenen Typen von Geschmackspapillen vorzufinden sind, wurden Gefrierschnitte von Tas2r131-defizienten hrGFP-Geschmackspapillen angefertigt, und auf die Expression des hrGFP-Reportergens hin untersucht (siehe 3.3.1.1). Da die Bitterrezeptoren an das im Geschmackssystem besonders stark exprimierte G-Protein α -Gustducin binden (Adler et al., 2000; Wong et al., 1996), sollte zusätzlich über immunhistochemische Versuchsansätze geprüft werden, ob der Bitterrezeptor Tas2r131 immer mit dem gustatorischen G-Protein colokalisiert erscheint.

Abbildung 12 fasst die erzielten Ergebnisse der Analyse der Expression des Tas2r131 in den drei Geschmackspapillen der fast vollständig kongenen Mauslinie exemplarisch zusammen. In Pilzpapillen, die im vorderen Zungenbereich vorkommen und jeweils nur eine Geschmacksknospe haben, konnten zwar vereinzelte α -Gustducin-exprimierende Zellen festgestellt werden, jedoch keine auf den Tas2r131 hindeutende hrGFP-Fluoreszenz (Abbildung 12 A-C). In Geschmacksknospen der Blätterpapillen, die seitlich im hinteren Bereich der Zunge situiert sind, konnte hingegen zusätzlich zur α -Gustducin-repräsentierenden roten Fluoreszenz auch die hrGFP-Fluoreszenz des Tas2r131-Rezeptors in den gleichen Zellen beobachtet werden (Abbildung 12 D-F). Anhand der hrGFP-Expression und der positiven Immunreaktion mit dem α -Gustducin-Antikörper konnte auch für die größte der Geschmackspapillen, die Wallpapille, die Coexpression von Tas2r131 und α -Gustducin in denselben Geschmackszellen belegt werden (Abbildung 12 G-I). Die Beobachtung der vermehrt auftretenden Expression des Tas2r131-Bitterrezeptors in den Geschmackspapillen des hinteren Zungenbereichs stimmt mit der quantitativen Expressionsanalyse der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Meyerhofer überein (Voigt et al., 2012) und bestätigt das zuvor beschriebene Geschmacksrezeptor-Expressionsmuster auf der Zunge. In den in Abbildung 12 dargestellten immunhistochemischen Ergebnissen wird außerdem deutlich, dass α -Gustducin nicht ausschließlich in Tas2r131-hrGFP Zellen exprimiert wird, sondern darüber hinaus in weiteren Geschmackszellen. Die Colokalisation von Rezeptor und G-Protein bekräftigt daher zum einen die Interaktion des Tas2r131 und des α -Gustducins (Chandrashekar et al., 2006; Wong et al., 1996). Zum anderen belegt die α -Gustducin-Expression in Tas2r131-negativen Zellen die Beteiligung der G-Protein-Untereinheit an der gustatorischen Signalweiterleitung in weiteren Geschmackszellen, zusätzlich zu den Tas2r131-positiven Zellen (Behrens et al., 2011; Mombaerts, 2004).

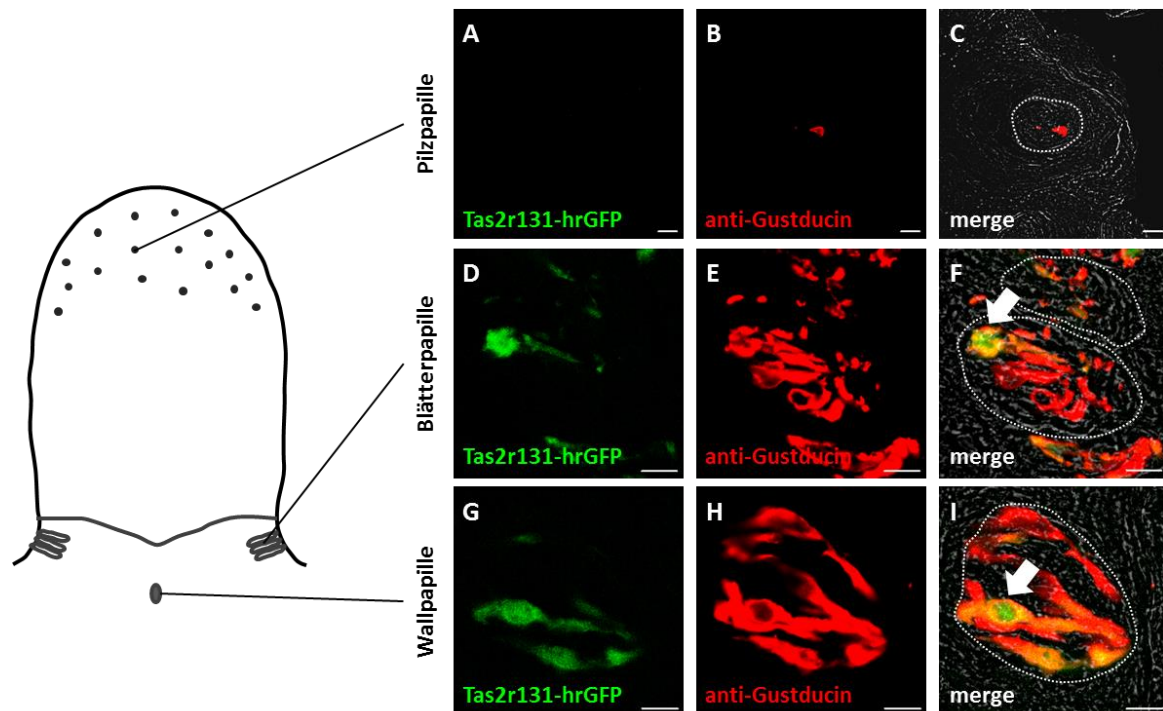


Abbildung 12: Tas2r131-Colokalisation mit α -Gustducin in verschiedenen Geschmackspapillen. Die schematische Zeichnung zeigt die Lokalisation der Pilz-, Blätter- und Wallpapille auf der murinen Zunge. Um zu prüfen, ob der Tas2r131 in allen drei Geschmackspapillen exprimiert wird und mit dem gustatorischen G-Protein colokalisiert ist, wurden Gefrierschnitte von Tas2r131-hrGFP Pilz-, Blätter- und Wallpapillen mit einem α -Gustducin-Antikörper und einem rot-fluoreszierenden Zweitantikörper (Alexa 546 konjugierter anti-Kaninchen Antikörper aus Easel) inkubiert. Gezeigt sind beispielhafte Aufnahmen von Tas2r131-hrGFP- und α -Gustducin-exprimierenden, spindelförmigen Geschmackszellen in Geschmacksknospen der Pilzpapille [C], Blätterpapille [F] und Wallpapille [I]. Eine Tas2r131-hrGFP Fluoreszenz konnte nicht in den Pilzpapillen an der Zungenspitze [A], jedoch in der Blätter- [D] und Wallpapille [G] beobachtet werden. α -Gustducin-exprimierende Geschmackszellen konnten hingegen in allen drei Typen der Geschmackspapillen nachgewiesen werden [B, E, H]. In Überlagerungen der endogenen hrGFP- und der anti- α -Gustducin-Fluoreszenzsignale wurde deutlich, dass eine Expression des Geschmacksrezeptors und der G-Protein α -Untereinheit in den gleichen Zellen erfolgt (Pfeil). Die Expression von α -Gustducin wurde darüber hinaus in weiteren Geschmackszellen der Wall- und Blätterpapille festgestellt und konnte zusätzlich in Tas2r131-negativen Pilzpapillen gefunden werden. Maßstab: 10 μ m.

4.1.1.2 Spezifitätstest eines neu generierten Tas2r131-spezifischen Antikörpers in Geschmackszellen

Zur Generierung eines Tas2r131-Antikörpers wurden zwei Kaninchen (Tier 842 + 843) jeweils mit zwei spezifischen Peptidsequenzen (N-terminale Sequenz: STTSEDSRTKIHKK; C-terminale Sequenz: SLHRFSSLY) immunisiert. Die vier gebildeten Antikörper wurden immobilisiert und Peptidspezifisch aufgereinigt. Die Spezifität der hergestellten Antikörper wurde überprüft, indem immunhistologische Markierungen von Geschmackszellen der Zunge durchgeführt wurden (siehe 3.3.1.1). Hierfür wurden Gefrierschnitte der Wallpapille von Wildtyp- und Tas2r131-defizienten Mäusen verwendet, wobei das Tas2r131-defiziente Gewebe als ideale Negativkontrolle fungierte, da aufgrund der Deletion der gesamten Tas2r131-codierenden Sequenz keine immunologische Reaktivität zu erwarten war.

Zu Beginn wurde eine Verdünnungsreihe der Antikörper an Tas2r131 [+/+]-Gewebeschnitten der Wallpapille getestet, und die Antikörper aufgrund der beobachteten schwachen Reaktivität der Immunglobuline (Daten nicht gezeigt) folglich in einer 1:50 Verdünnung (2 μ g/ml) eingesetzt. In

den, in Abbildung 13 dargestellten repräsentativen Fluoreszenzaufnahmen ist deutlich zu erkennen, dass alle vier Antikörper aus beiden Kaninchen die spindelförmigen Geschmackszellen in den Geschmacksknospen der Wallpapille markieren (Abbildung 13).

Aus den in Abbildung 12 zusammengefassten GFP-Markierungen der Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Reportermauslinie hat sich bereits gezeigt, dass in einer Geschmacksknospe der Wallpapille ungefähr 1-3 Zellen den Tas2r131-Rezeptor exprimieren, was mit bereits publizierten Daten (Voigt et al., 2012) sowie den Vorarbeiten von Frau Dr. Dorke Meyer übereinstimmt (Meyer, 2013). Vergleicht man diesen Befund nun aber mit denen hier vorgestellten Studien zur Spezifitätsbestimmung der produzierten anti-Tas2r131 Antikörper, so wird deutlich, dass die anti-Tas2r131-Markierung für IgGs beider Kaninchen in wesentlich mehr Zellen zu erkennen ist, als zu erwarten gewesen wäre: Die rote Fluoreszenz ist in fast in allen spindelförmigen Zellen der Geschmacksknospe der angeschnittenen Wallpapille zu erkennen (Abbildung 13 A, C, E, G). Dieses Markierungsmuster deutet darauf hin, dass neben dem Tas2r131 noch andere, möglicherweise sehr homologe Bitterrezeptoren von allen vier produzierten anti-Tas2r131 Antikörpern detektiert werden.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden zusätzlich immunhistochemische Studien an Zungen-Gewebeschnitten der Tas2r131-defizienten Mauslinie durchgeführt. Die Wahl dieser Gewebekontrolle hat den Vorteil, dass zum einen kein Tas2r131 exprimiert wird; zum anderen kann mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz abgeschätzt werden, wie viele Zellen in der Wildtyp-Geschmacksknospe tatsächlich den Tas2r131 exprimieren. Und schließlich kann durch Verwendung der neu generierten Tas2r131 Antikörper und eines Alexa546-gekoppelten Sekundärantikörpers direkt festgestellt werden, ob die Immunreaktivität der Tas2r131-Antikörper in den gleichen oder auch anderen Zellen, als den hrGFP-positiven Zellen, zu registrieren ist.

Die in Abbildung 13 ausgewählten Aufnahmen der Immunmarkierung an coronalen Schnitten der Wallpapille einer Tas2r131-defizienten Maus zeigen jeweils die grüne GFP-Fluoreszenz und die Bindung der Tas2r131-Antikörper, die hier in rot dargestellt ist (Abbildung 13 B, D, F, H). Eine Analyse der Markierungen macht deutlich, dass alle Tas2r131-Antikörper, trotz der fehlenden Expression des Bitterrezeptors, eine deutliche Markierung im Tas2r131-defizienten Zungengewebe aufweisen. Zudem ist zu erkennen, dass die rote Fluoreszenz nicht nur in GFP-negativen Zellen (Abbildung 13 B, D, F, H; Pfeile) sondern auch in GFP-positiven Zellen auszumachen ist (Abbildung 13 B, D, F, H; gelbe Markierung, Pfeilspitzen).

Aus den Befunden dieser Studien muss daher geschlossen werden, dass, trotz der Auswahl zweier Tas2r131-spezifischen Peptidsequenzen zur Immunisierung der Kaninchen, die produzierten Antikörper offenbar neben dem Tas2r131 noch weitere Rezeptoren aus der Bitterrezeptorfamilie, andere GPCRs in den Geschmackszellen (z. B. ORs (Kang and Koo, 2012)) oder sogar unspezifisch andere Proteine erkennen. Zusätzlich ist für die neu generierten Antikörper festzuhalten, dass die Immunreaktivität der C-terminal ausgerichteten Tas2r131-Antikörper beider Kaninchen stärker ausgeprägt war, als die Antigen-Antikörper-Reaktion der Tas2r131-Antikörper, die eine weiter N-terminal-gelegene Peptidsequenz in der Tas2r131-Aminosäuresequenz erkennen.

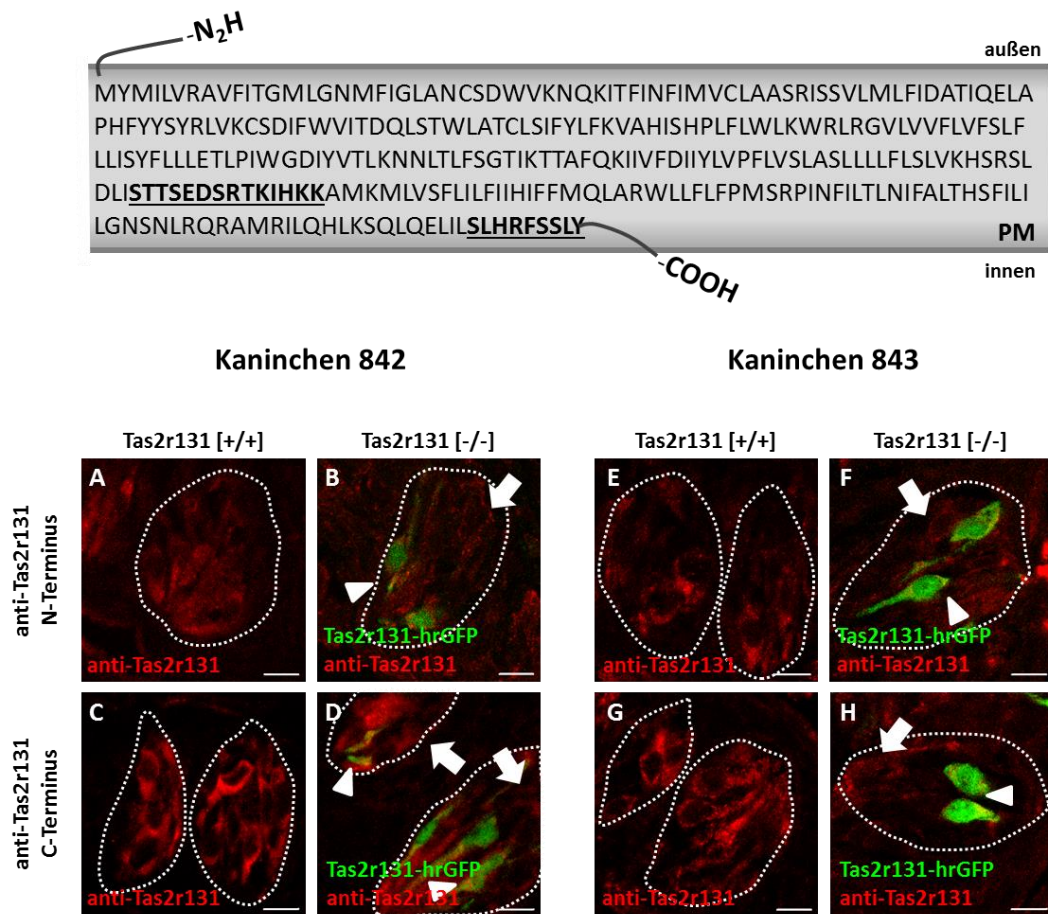


Abbildung 13: Untersuchungen zur Spezifität von anti-Tas2r131 Antikörpern. Die schematische Abbildung zeigt den Tas2r131-Rezeptor, dessen Aminosäuresequenz in der Plasmamembran (PM) dargestellt ist. Die zur Immunisierung eingesetzten Peptide sind jeweils durch einen Unterstrich hervorgehoben. Zur Generierung von Tas2r131-spezifischen Antikörpern wurden zwei Kaninchen (842 + 843) mit den spezifischen Peptiden immunisiert. Die gebildeten Antikörper wurden anschließend aufgereinigt und an Gefrierschnitten der Wallpapille von Wildtyp- und Tas2r131-hrGFP Mäusen getestet. Hierfür wurden die Gewebeschnitte mit einer 1:50 Verdünnung der aufgereinigten Antikörper inkubiert und anschließend mit einem rot-fluoreszierenden Zweitantikörper (Alexa 546 konjugierter anti-Kaninchen Antikörper aus Esel) die Antigen-Antikörperbindung nachgewiesen.

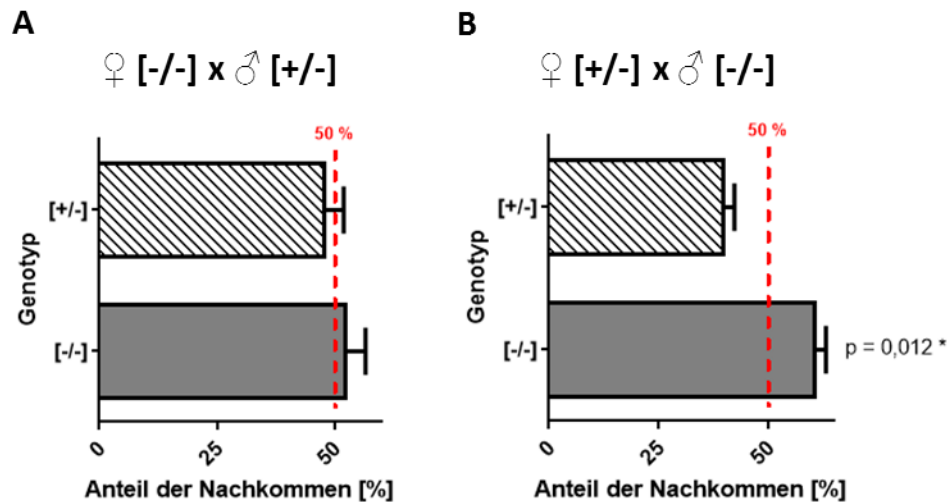
Die Aufnahmen von einzelnen Geschmacksknospen in [A, B, E, F] zeigen Reaktionen des Tas2r131-Antikörpers, der eine N-terminale Peptidsequenz erkennt, wohingegen [C, D, G, H] immunologische Reaktionen des gegen den C-Terminus der Tas2r131-Peptidsequenz gerichteten Antikörpers demonstrieren. In allen Geschmacksknospen von Wildtyp-Gewebeschnitten [A, C, E, G] sind zahlreiche und deutliche Geschmackszellmarkierungen durch die einzelnen Tas2r131-Antikörper zu erkennen. In Kontrollschnitten der Tas2r131-hrGFP Maus [B, D, F, H], in der die codierende Sequenz entfernt und durch eine hrGFP-Sequenz unter der Tas2r131-Promotorkontrolle ersetzt wurde, sind Signale des Antikörpers (rot) und des endogenen hrGFPs (grün) in der Überlagerung colokalisiert (gelb) zu erkennen [B, D, F, H; Pfeilspitzen]. Die Erkennung von Tas2r131-hrGFP Zellen und weiterer Geschmackszellen [B, D, F, H; Pfeile], lässt eine unspezifische Erkennung weiterer Bitterrezeptoren bzw. anderer GPCRs durch alle vier generierten Antikörper vermuten. Geschmacksknospen der Wallpapille sind jeweils durch eine Randmarkierung hervorgehoben. Maßstab: 10 µm.

4.1.2 Analyse der möglichen Ursache einer Genotypverschiebung in Nachkommen geschlechtsspezifischer heterozygoter Tas2r131-Zuchtpaare

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, haben frühere Arbeiten an der Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Mauslinie gezeigt, dass von Tas2r131-Zuchtpaaren mit einem Tas2r131 [+/+]-Weibchen und

einem Tas2r131 $+/ -$ -Männchen signifikant mehr heterozygote Tas2r131-Nachkommen gezeugt werden, als nach den Mendelschen Vererbungslehren zu erwarten gewesen wäre (Meyer, 2013). Im Weiteren wurde deshalb geprüft, ob die beobachtete Genotypverschiebung durch eine größere Subpopulation an Tas2r131 $-$ haploiden Spermien in heterozygoten Tas2r131-Männchen zu erklären ist. Wenn ja, sollte auch in Zuchtpaaren mit homozygot defizienten Tas2r131-Männchen und heterozygoten Tas2r131-Weibchen eine Genotypverschiebung unter den Nachkommen festzustellen sein. Aus Verpaarungen von Elterntieren mit einem heterozygoten- und einem homozygot defizienten Genotyp können ausschließlich heterozygote- und homozygot defiziente Nachkommen geboren werden, wobei der Anteil der Nachkommen mit einem bestimmten Genotyp bei jeweils 50 % liegt. Um diese Genotypverteilung unter den Nachkommen genauer zu untersuchen wurden die Anteile der heterozygoten $+/ -$ - und homozygot defizienten $-/-$ -Genotypen aller Nachkommen von Zuchtpaaren mit einem homozygot defizienten Tas2r131 $-/-$ -Weibchen und einem heterozygoten Tas2r131 $+/ -$ -Männchen bzw. von Zuchtpaaren mit einem heterozygoten Tas2r131 $+/ -$ -Weibchen und einem homozygot defizienten Tas2r131 $-/-$ -Männchen bestimmt. Die erfassten prozentualen Anteile der entstandenen Genotypen aus geschlechtsspezifischen Tas2r131-Verpaarungen wurden durch den statistischen Chi-Test auf die Abweichung von der erwarteten Mendelschen Verteilung hin untersucht.

In Abbildung 14 A und B sind die Genotypverteilungen der Jungtiere der jeweils darüber angegebenen geschlechtsspezifischen Tas2r131-Verpaarungen gezeigt. Während bei Verpaarungen von homozygot defizienten Tas2r131-Weibchen mit heterozygoten Tas2r131-Männchen unter den Nachkommen eine statistisch zu erwartende Mendelsche Verteilung beobachtet werden konnte ($+/ -$ 48 % Jungtiere, $-/-$ 52 % Jungtiere; $p = 0,599$) (Abbildung 14 A), war die Verteilung der Genotypen unter Nachkommen der Verpaarungen, in denen das Männchen Tas2r131-defizient war, zugunsten der homozygot defizienten Nachkommen signifikant verschoben ($+/ -$ 40 % Jungtiere, $-/-$ 60 % Jungtiere; $p = 0,012$) (Abbildung 14 B). Die Befunde der untersuchten Genotypverteilung der Jungtiere der geschlechtsspezifischen Tas2r131-Verpaarungen zeigen, dass eine Abweichung der beobachteten Genotyp-Häufigkeit unter den Nachkommen nur dann festzustellen war, wenn das Männchen homozygot defizient für den Tas2r131-Rezeptor war. Diese Befunde zeigen, dass die beobachtete Genotypverschiebung tatsächlich durch die Tas2r131-defiziente Spermien-Population hervorgerufen werden könnte, da der Genotyp der Tas2r131-Weibchen keinen Einfluss zu haben scheint.



Tas2r131 ♀ x ♂	[+/+] x [+/+]	[-/-] x [+/-]	[+/-] x [-/-]
Wurfabstand [d]	33,2 ± 2,0	26,4 ± 1,5 *	33,6 ± 2,0
Wurfgröße	6,0 ± 0,2	7,0 ± 0,5	6,8 ± 0,2
Würfe / Paare	40 / 8	20 / 4	22 / 4

Abbildung 14: Genotypverteilung der Nachkommen geschlechtsspezifischer, homozygot defizienter Tas2r131-Zuchtpaare und die Analyse der Fertilitätsparameter. Für die Untersuchung der Auswirkung der Tas2r131-Defizienz auf die Genotypverteilung der Nachkommen von geschlechtsspezifischen Tas2r131 homozygot defizienten Zuchtpaaren wurden die Genotypen der Nachkommen bestimmt, und anschließend der Anteil des jeweiligen Genotyps an der Gesamtzahl der untersuchten Nachkommen berechnet. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der erfassten Genotypen und die nach Mendel zu erwartende Genotypverteilung der Nachkommen (rot gestrichelte Linie) der angegebenen Verpaarungsansätze.

In Zuchtpaaren, deren Weibchen Tas2r131 homozygot defizient und deren Männchen Tas2r131-heterozygot sind, ist eine nach den Mendelschen Vererbungsregeln zu erwartende Häufigkeit der Genotypen zu beobachten **[A]**. Werden hingegen Tas2r131 [+/-]-Weibchen mit Tas2r131 [-/-]-Männchen verpaart, kann eine signifikante Verschiebung der Genotypverteilung der Nachkommen zugunsten der Tas2r131 homozygot defizienten Jungtiere festgestellt werden **[B]**. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 130 Jungtieren aus 19 Würfen **[A]** bzw. 144 Jungtieren aus 21 Würfen **[B]**. Für die statistische Analyse der Genotypverteilung wurde der Chi-Test angewandt ($p \leq 0,05$ *).

Zur weiteren Überprüfung eines möglicherweise geschlechtsspezifischen Einflusses der Tas2r131-Defizienz auf den Reproduktionserfolg wurden zudem entweder homozygot defiziente Tas2r131-Weibchen mit heterozygoten Männchen oder heterozygote Tas2r131-Weibchen mit homozygot defizienten Männchen kontinuierlich monogam miteinander verpaart. Dabei wurde jeweils der Abstand zwischen den einzelnen Würfen und die Wurfgröße erfasst. Die Ergebnisse dieser Fertilitätsparameter der analysierten Zuchtpaare sind tabellarisch als Mittelwerte ± SEM angegeben und wurden über den unpaarigen statistischen T-Test mit den Ergebnissen von Wildtyp-Zuchtpaaren (C57BL/6N) verglichen ($p \leq 0,05$ *).

Für Verpaarungen eines homozygot defizienten Tas2r131 [-/-]-Weibchens mit einem heterozygoten Tas2r131 [+/-]-Männchen bzw. einem Tas2r131 [+/-]-Weibchens mit einem Tas2r131 [-/-]-Männchen wurden parallel zur Genotypbestimmung der Nachkommen, der zeitliche Wurfabstand (d) und die Wurfgröße erfasst. Diese Beobachtungen wurden anschließend mit denen von C57BL/6N-Verpaarungen verglichen und mit Hilfe des unpaarigen T-Tests statistisch bewertet. Während in reinen homozygot defizienten Tas2r131-Verpaarungen der Abstand zwischen zwei Würfen etwas, jedoch nicht signifikant kürzer war ($28,5 \pm 2,8$ Tage)

als in C57BL/6N-Verpaarungen ($33,2 \pm 2,0$ Tage) (Tabelle 5), war in Verpaarungen mit homozygot defizienten Weibchen und heterozygoten Tas2r131-Männchen der Wurfabstand signifikant verkürzt ($26,4 \pm 1,4$ Tage; $p = 0,009$) (Abbildung 14). War der Tas2r131 homozygot defiziente Elternteil das Männchen, war diese Veränderung nicht mehr zu beobachten, und der Abstand zwischen den Würfen ($33,6 \pm 2,0$ Tage, $p = 0,864$) ähnlich zu dem der C57BL/6N-Verpaarungen (Abbildung 14). Während in heterozygoten- und Tas2r131 homozygot defizienten Verpaarungen keine signifikanten Veränderungen des Wurfabstands, aber eine signifikant erhöhte Wurfgröße festgestellt werden konnte (Tabelle 5), war die Wurfgröße in den Tas2r131 [-/-] x [+/-]- und Tas2r131 [+/-] x [-/-]-Verpaarungen zwar erhöht, jedoch nicht signifikant unterschiedlich zu der C57BL/6N-Wurfgröße (Tas2r131 [-/-] x [+/-]: $7,0 \pm 0,5$ Jungtiere, $p = 0,138$; Tas2r131 [+/-] x [-/-]: $6,8 \pm 0,2$ Jungtiere, $p = 0,224$) (Abbildung 14).

Tabelle 5: Fertilität von Tas2r131-defizienten Mäusen. Zur Untersuchung des Reproduktionsphänotyps von Tas2r131-defizienten Mäusen wurden heterozygote- und homozygot defiziente Tas2r131-Tiere dauerhaft monogam verpaart, und die aufgeführten Fertilitätsparameter (Wurfabstand [d], Wurfgröße) bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines unpaarigen T-Tests mit den Zuchtergebnissen von C57BL/6N ([+/+] x [+/+]) statistisch verglichen, und signifikant abweichende Resultate mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM; $p \leq 0,05$ *.

Tas2r131 ♀ x ♂	[+/+] x [+/+]	[+/-] x [+/-]	[-/-] x [-/-]
Wurfabstand [d]	$33,2 \pm 2,0$	$30,7 \pm 1,1$	$28,5 \pm 2,8$
Wurfgröße	$6,0 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,1$ *	$7,7 \pm 0,2$ *
Würfe / Paare	40 / 8	110 / 28	11 / 4

Die erhöhte Wurfgröße von Tas2r131 heterozygoten- und homozygot defizienten Zuchtpaaren (Tabelle 5) sowie von geschlechtsspezifischen Tas2r131-Verpaarungen, ebenso wie die registrierte auf das Männchen zurückzuführende Genotypverschiebung der Nachkommen zugunsten homozygot defizienter Tas2r131-Jungtiere (Abbildung 14) führten anschließend zu der Fragestellung, ob die vermehrt geborenen Tas2r131-defizienten Tiere aus Tas2r131 [+/-] x [-/-]-Verpaarungen überwiegend männlich sind, so dass zusätzlich zur Genotypverschiebung eine Geschlechterverschiebung zu registrieren sein sollte. Daher wurden die Geschlechter der Nachkommen aus Tas2r131 [-/-] x [+/-]- und Tas2r131 [+/-] x [-/-]-Verpaarungen bestimmt und anschließend geprüft, ob es innerhalb eines auftretenden Genotyps zu der nach Mendelschen Regeln zu erwarteten Häufigkeit von 50 % des weiblichen und des männlichen Geschlechts kommt.

In Tabelle 6 sind die beobachteten prozentualen Geschlechteranteile für jeden möglichen Genotyp ([+/-] oder [-/-]) der Nachkommen (F1-Generation) aus den angegebenen Verpaarungen aufgelistet. Es ist zu erkennen, dass für jeden auftretenden Genotyp in der F1-Generation, unabhängig von der geschlechtsspezifischen Tas2r131-Verpaarung, keine signifikante Abweichung von der erwarteten Geschlechterverteilung auftrat, für deren Berechnung der statistische Chi-Test angewandt wurde. Die in Abbildung 14 beobachtete Genotypverschiebung in Tas2r131 [+/-] x [-/-]-Verpaarungen ist daher nicht damit zu erklären, dass die scheinbar bessere Vererbung des Tas2r131 homozygot defizienten Allels durch das

Zuchtmännchen dazu führt, dass die Weitergabe der genetischen Information überwiegend an ein Geschlecht erfolgt.

Tabelle 6: Prozentuale Anteile der Geschlechterhäufigkeit in der F1-Generation bezogen auf den beobachteten Genotyp von Nachkommen aus geschlechtsspezifischen Tas2r131-Verpaarungen. Aus den angegebenen Verpaarungsansätzen sind die möglichen Genotypen in der F1-Generation und die prozentualen Anteile der beobachteten Geschlechterverteilung eines Genotyps tabellarisch aufgelistet. Grundlage dieser Auswertung sind die in Abbildung 14 eingegangenen Datensätze der analysierten Würfe. Für jeden beobachteten Genotyp ([+/-] oder [-/-]) wurde eine Geschlechterverteilung von jeweils 50 % erwartet. Die Abweichung der bestimmten Geschlechterhäufigkeit von der erwarteten Geschlechterhäufigkeit wurde mit dem Chi-Test überprüft. Es konnte weder für die bisher unauffällige Tas2r131 [-/-] x [+/-]-Verpaarung noch für die Tas2r131 [+/-] x [-/-]-Verpaarung, für die eine Genotypverschiebung zugunsten der homozygot defizienten Nachkommen beobachtet wurde, eine veränderte Geschlechterverteilung unter den Nachkommen festgestellt werden. Die prozentualen Anteile der geborenen [-/-]-Weibchen und -Männchen an der Gesamt [-/-]-Nachkommensanzahl der Tas2r131 [+/-] x [-/-]-Verpaarung sind fett gedruckt dargestellt, um so hervorzuheben, dass nicht mehr Männchen mit dem Tas2r131 homozygot defizienten Allel geboren werden. Gezeigt sind die prozentualen Anteile der beobachteten Geschlechterhäufigkeit innerhalb eines auftretenden Genotyps von Nachkommen aus der entsprechend angegebenen Verpaarung. Statistischer Test: Chi-Test; $p \leq 0,05$ *.

		mgl. Genotypen der F1-Generation			
		[+/-]		[-/-]	
Verpaarung	Geschlecht	♀	♂	♀	♂
[-/-] x [+/-]		59	41	45	55
[+/-] x [-/-]		49	51	53	47

Die bisherige Analyse der Reproduktionsparameter der geschlechtsspezifischen Tas2r131-Verpaarungen (Tabelle 5, Tabelle 6) lässt keine kausale Ursache dafür erkennen, warum Zuchtpaare mit einem heterozygoten Tas2r131-Weibchen und einem homozygot defizienten Tas2r131-Männchen mehr Nachkommen mit einem homozygot defizienten Genotyp zeugen, als statistisch nach Mendel zu erwarten wäre (Abbildung 14). Allerdings muss in diesem Zusammenhang erwähnt werden, dass die Schwanzspitzenbiopsien der Nachkommen, die als Grundlage für die Genotypisierung fungieren, erst zum Zeitpunkt der Trennung von den Elterntieren, also nach den ersten drei Lebenswochen der Jungtiere, vorgenommen wurden (siehe 3.2.1). Daher stellte sich die Frage, ob in den ersten drei Wochen nach der Geburt die postnatale Mortalitätsrate von Jungtieren des heterozygoten Genotyps erhöht ist, so dass die beobachtete Genotypverschiebung auf eine verbesserte Überlebensrate der Tas2r131 [-/-]-Jungtiere zurückzuführen ist.

Aus diesem Grund lag es nahe zu überprüfen, ob die Nachkommen der Tas2r131 [+/-] x [-/-]-Zuchtpaare eine erhöhte postnatale Mortalitätsrate aufweisen (siehe 3.2.1.2). Für diese Analyse wurde die Anzahl der in den ersten drei Lebenswochen verstorbenen Jungtiere von C57BL/6N ([+/+]), Tas2r131-heterozygoten ([+/-]), -homozygot defizienten ([-/-]) und geschlechtsspezifischen Tas2r131-Verpaarungen ([-/-] x [+/-] bzw. [+/-] x [-/-]) erfasst. Die Mortalitätsraten der einzelnen Verpaarungsansätze wurden mit den Beobachtungen der C57BL/6N-Zuchtpaare mit Hilfe des unpaarigen statistischen T-Tests verglichen. Da es aus

technischen Gründen nicht möglich war, den Genotyp der toten Jungtiere zu bestimmen, war es bezüglich der Bestimmung der Überlebensrate der Nachkommen notwendig, den prozentualen Anteil verstorbener Jungtiere in Bezug auf die Wurfgröße zu berechnen, und dann die Mittelwerte der Sterblichkeitsraten für die Nachkommen der einzelnen Verpaarungsansätze zu vergleichen.

Abbildung 15 macht deutlich, dass die unterschiedlichen Verpaarungsansätze keine statistisch signifikant veränderten Sterblichkeitsraten zeigten, was möglicherweise auf eine zu geringe Anzahl an analysierten Jungtieren zurückzuführen sein könnte. Auffällig war jedoch, dass in den homozygot defizienten Verpaarungen ($[-/-] \times [-/-]$), ebenso wie in den Verpaarungen mit einem heterozygoten Tas2r131-Zuchtweibchen und einem homozygot defizienten Tas2r131-Zuchtmännchen ($[+/-] \times [-/-]$), deutlich weniger Nachkommen in den ersten drei Wochen nach der Geburt verstarben.

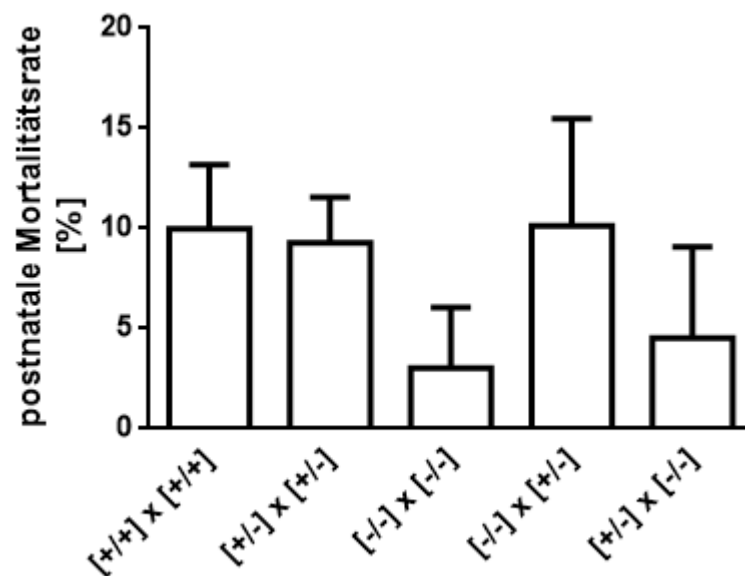


Abbildung 15: Sterblichkeitsrate der Nachkommen von heterozygoten und homozygoten Tas2r131-Zuchtpaaren. Für die Nachkommen jedes Wurfs wurde der prozentuale Anteil verstorbener Jungtiere in den ersten drei Lebenswochen berechnet und der Mittelwert für einen Verpaarungsansatz gebildet. Es ist erkennbar, dass deutlich weniger Nachkommen aus homozygot defizienten Tas2r131-Verpaarungen sowie Verpaarungen mit Tas2r131 $[+/-]$ -Weibchen und Tas2r131 $[-/-]$ -Männchen frühzeitig versterben. Mit Hilfe des unpaarigen T-Tests konnte dieser Unterschied im Vergleich zu C57BL/6N $[+/-]$ -Verpaarungen allerdings nicht als signifikant interpretiert werden. Eingehende Würfe/Jungtiere/Todesfälle: $[+/-] \times [+/-]$ 40/240/19; $[+/-] \times [+/-]$ 110/790/54; $[-/-] \times [-/-]$ 11/85/3; $[-/-] \times [+/-]$ 20/140/9; $[+/-] \times [-/-]$ 22/149/3. Statistischer Test: unpaariger T-Test: $p \leq 0,05$ *.

Die bisher durchgeführten Analysen der Genotyp-abhängigen Geschlechterverteilungen (Tabelle 6) und der untersuchten Sterblichkeitsraten (Abbildung 15) gaben keine kausale Erklärung für die registrierte Genotypverschiebung von Nachkommen aus Tas2r131 $[+/-] \times [-/-]$ -Zuchtpaaren (Abbildung 14). Eine weitere mögliche Ursache des signifikant häufiger auftretenden Tas2r131-defizienten Genotyps unter den Nachkommen der Tas2r131 $[+/-] \times [-/-]$ -Zuchtpaare könnte eine verstärkte Motilität der Tas2r131-defizienten Spermien sein. Bereits von Frau Dr. Dorke Meyer begonnene und in der vorliegenden Arbeit fortgeführte Computer-unterstützte

Motilitätsanalysen an Spermien von Tas2r131 ^{BL-IRES-hrGFP} [-/-]-Männchen im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistertieren (Rückkreuzungsgrad auf C57BL/6: 75-98,4 %) (siehe 3.4.1.4) zeigten jedoch keinen auffälligen Befund einer erhöhten Motilität, der die Genotypverschiebung in geschlechtsspezifischen Zuchtpaaren erklären könnte.

4.1.3 Quantitative und morphologische Untersuchungen an Tas2r131-defizienten Hodengewebe und Spermien

Die Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Mauslinie wurde durch die Injektion von genetisch manipulierten embryonalen Stammzellen in Blastozysten des C57BL/6-Mausstamms generiert, wobei die verwendeten Zellen aus der murinen ES-Zelllinie R1 des Donorstamms 129/Sv stammten (Voigt et al., 2012). Hierbei wurde ein spezifischer genetischer Locus von dem Donorstamm auf einen Rezipientenstamm (C57BL/6) übertragen. Nachkommen dieser genetisch manipulierten Tiere haben deswegen einen gemischten genetischen Hintergrund mit genomischen Anteilen beider Mausstämme (129/Sv und C57BL/6). Zur Reduzierung der Variabilität der Versuchsergebnisse, die auf einen gemischten genetischen Hintergrund zurückzuführen ist (Montagutelli, 2000; Silva, 1997; Yoshiki and Moriwaki, 2006), wurde eine kongene Mauslinie gezüchtet. Eine Mauslinie wird als kongen bezeichnet, die den übertragenen genetischen Locus mit dem genetischen Hintergrund des Rezipientenstamms trägt, wobei der genetische Anteil des Donorstamms nahezu vollständig verdrängt ist (Flaherty, 1981; Snell, 1978). Um eine solche kongene Mauslinie zu etablieren, werden durch das mehrfache Rückkreuzen eines heterozygoten Tiers mit einem Tier des Rezipientenstamms die Donorstamm-Allele durch die genetischen Anteile des Rezipientenstamms ersetzt, und dadurch sukzessive der Donorstammanteil im Genom minimiert. Eine Mauslinie wird nach zehn Rückkreuzungsgenerationen als vollständig kongen bezeichnet (Greenhouse, 1990; Zimmermann F, 2000) und ist, bis auf den zu untersuchenden genetischen Locus, in allen Genloci identisch mit dem Rezipientenstamm. Mäuse, die in mindestens sechster Generation auf einen Mausstamm zurückgekreuzt wurden, und deren Genom dadurch zu 98,4 % identisch mit dem Rezipientenstamm-Genom ist, werden als „beginnend kongen“ bezeichnet und können bereits im Vergleich zu Wildtyp-Tieren des Mausstamms für Studien eingesetzt werden (Quelle: Jackson Laboratory). Die in Frau Dr. Dorke Meyers Dissertation verwendeten Tiere der Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Mauslinie stammten aus unterschiedlichen Rückkreuzungsgenerationen, die jedoch noch nicht beginnend kongen waren (genetischer C57BL/6 Anteil < 98,4 %). Um die Auswirkungen des gemischten genetischen Hintergrunds der 129/Sv- und C57BL/6-Mausstämme weiterhin zu minimieren, wurden in der vorliegenden Arbeit für die weiterführenden Untersuchungen der Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Mauslinie Tiere eingesetzt, die in sechster Generation auf den C57BL/6N-Mausstamm (= N6; 98,4 % C57BL/6N) zurückgekreuzt waren.

4.1.3.1 Subzelluläre Lokalisation des Tas2r131 in Gewebe des murinen männlichen Reproduktionstrakts

Um zu überprüfen, ob das beobachtete testikuläre Expressionsmuster des Tas2r131 in nicht-kongen Tas2r131-Männchen mit der subzellulären Verteilung des hrGFP-Reporterproteins in Tas2r131-defizienten Männchen, die in sechster Generation auf den C57BL/6N-Mausstamm zurückgekreuzt waren, übereinstimmt, wurde die Tas2r131-Lokalisation auf histologischer Ebene

überprüft. Als Negativkontrolle wurden für diese Untersuchung zusätzliche Analysen an Tas2r131 $[+/+]$ -Mäusen durchgeführt, für die keine grüne hrGFP-Fluoreszenz erwartet werden kann.

Aus einigen Veröffentlichungen war bekannt, dass das G-Protein α -Gustducin im männlichen Reproduktionsgewebe unterschiedlicher Spezies exprimiert wird (Fehr et al., 2007; Li and Zhou, 2012; Mosinger et al., 2013; Spinaci et al., 2014). Für den Vergleich des Tas2r131-hrGFP-Expressionsorts mit dem des α -Gustducins, wurden zusätzlich immunhistochemische Studien mit einem anti- α -Gustducin Antikörper an Tas2r131 $[+/+]$ -Mäusen durchgeführt.

In Abbildung 16 sind exemplarische Aufnahmen von immunhistochemischen Studien an Gefrierschnitten des Hodens (Abbildung 16 A-C; siehe 3.3.1.1) und ausgestrichenen Spermien (Abbildung 16 D-F; siehe 3.3.1.3) von Tas2r131 $[+/+]$ - und Tas2r131 $[-/-]$ -Mäusen (genetischer Hintergrund N6) gezeigt.

Die Abbildung 16 A und D zeigen immunologische, in rot dargestellte anti- α -Gustducin Antikörperreaktionen an Gewebeschnitten des Hodens und isolierten epididymalen Spermien. Die auf den anti- α -Gustducin Antikörper zurückzuführende rote Fluoreszenz ist vermehrt in den inneren Bereichen eines jeden Hodentubulus zu beobachten. Da die Spermatogenese in den Hodentubuli von außen nach innen verläuft, und vom Lumen aus die reifsten Spermien in den Nebenhoden gelangen, kann die α -Gustducin Expression auf die späten Spermatogenesestadien eingegrenzt werden (Abbildung 16 A). In Spermien konnte mit Hilfe des anti- α -Gustducin Antikörpers und eines akrosomalen Markers (*peanut agglutinin*, PNA; siehe 3.3.1.3.3), der FITC-gekoppelt war und damit im grünen Wellenlängenbereich emittiert, eine akrosomale Sichelmarkierung (Abbildung 16 D; Pfeilspitze) sowie eine leichte Mittelstück-Markierung im Flagellum (Abbildung 16 D; Pfeil) beobachtet werden. Unbehandelte Gewebeschnitte und ausgestrichene Spermien von Tas2r131 $[+/+]$ -Männchen zeigen, den Erwartungen entsprechend, keine endogene hrGFP-Fluoreszenz (Abbildung 16 B und E).

Die grüne Fluoreszenz des Reportergens war in Gefrierschnitten von Tas2r131 $[-/-]$ -Hoden erkennbar (Abbildung 16 C) und zeigte in einem Querschnitt eines Hodentubulus die gleiche Lokalisation, wie sie für das α -Gustducin bereits beschrieben wurde, nämlich in den späten Spermatogenesestadien (Fehr et al., 2007). In den Spermien hingegen wurde keine α -Gustducin-ähnliche Expression des hrGFPs beobachtet. Stattdessen ist in Abbildung 16 F eine deutliche hrGFP-Fluoreszenz im sogenannten *cytoplasmic droplet* am Ende des mitochondrienreichen Mittelstücks des Flagellums zu erkennen (Abbildung 16 F; Pfeil). Während der Spermatogenese phagozytieren die Sertoli Zellen große Teile des Zytoplasmas der männlichen Keimzellen, wobei noch verbleibende nicht phagozytierte Reste des Zytoplasmas im *cytoplasmic droplet* des Spermiums ausgelagert werden (Cooper, 2005). Das in der Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Mauslinie exprimierte Reporterprotein ist aufgrund fehlender Zielsignale, mit denen funktionelle Proteine normalerweise versehen werden, im Zytoplasma der Zelle lokalisiert, wohingegen der endogene Tas2r131-Rezeptor zur Plasmamembran transportiert würde. Wegen der zu erwartenden zytoplasmatischen Lokalisation des hrGFPs könnte es daher durchaus möglich sein, dass das Fluoreszenzprotein in das *cytoplasmic droplet* transportiert wird.

Anhand der gezeigten Aufnahmen konnte belegt werden, dass die Expression des Bitterrezeptors Tas2r131, unabhängig vom genetischen Hintergrund der Männchen, im Reproduktionsgewebe in den späten Stadien der Spermatogenese stattfindet, und dass die Lokalisation des gustatorischen Signalproteins im Flagellum der Spermien und dort vermehrt im *cytoplasmic droplet* festzustellen ist.

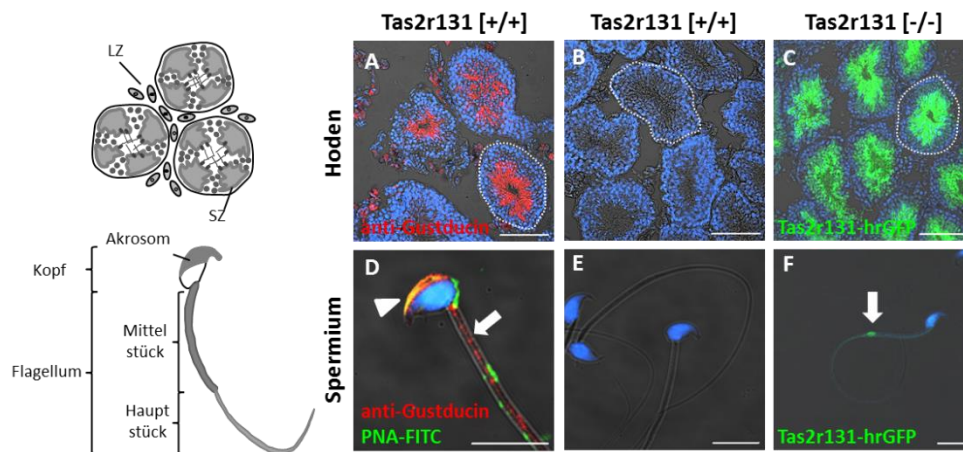


Abbildung 16: Expression der gustatorischen Signalproteine α -Gustducin und Tas2r131 in Hodengewebe und Spermien der Maus. Zur Untersuchung des Tas2r131-Expressionsorts im männlichen Reproduktionsgewebe und für vergleichende Studien mit dem G-Protein α -Gustducin wurden Gefrierschnitte des Hodens und isolierte epididymale Spermien von Tas2r131 [+/+] und Tas2r131 [-/-]-Mäusen analysiert. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen von Hoden-Gefrierschnitten und ausgetrichenen epididymalen Spermien einer Tas2r131 [+/+] [A, B, D, E] sowie einer Tas2r131 [-/-]-Maus [C, F]. Das Gewebe der Tas2r131 [+/+] Maus fungierte sowohl zur Demonstration der α -Gustducin-Expression als auch als Negativkontrolle für die hrGFP-Fluoreszenz. Durch die Behandlung mit einem anti- α -Gustducin Antikörper und einem Alexa 546 konjugierten anti-Kaninchen Antikörper aus Esel konnte in Tas2r131 [+/+] Hodenschnitten die Lokalisation des α -Gustducins in den späten Stadien der Spermatogenese in den inneren Bereichen eines Hodentubulus bestätigt werden [A]. Bei Betrachtung der subzellulären Lokalisation des α -Gustducin-Signals in epididymalen Spermien wird deutlich, dass das G-Protein im akrosomalen Bereich des Spermienkopfes vorkommt und mit dem grün-fluoreszierenden Signal des akrosomalen Markers PNA-FITC kolokalisiert erscheint. Durch die Überlagerung des roten α -Gustducin- und des grünen PNA-Signals erscheint diese Kolokalisation gelb [D; Pfeilspitze]. Im Flagellum des Spermiums war eine rot dargestellte α -Gustducin-Markierung zusätzlich im Mittelstück erkennbar [D, Pfeil]. In Gefrierschnitten des Hodens und in isolierten Spermien einer Tas2r131 [+/+] Maus [B+E] war keine hrGFP-Fluoreszenz zu beobachten. Ähnlich den anti- α -Gustducin markierten Tas2r131 [+/+] Hodenschnitten, war in Tas2r131 [-/-]-Gewebeschnitten eine Tas2r131-repräsentierende, grüne Fluoreszenz in Stadien der Spermatozyten und Spermatiden zu sehen [C]. Epididymale Spermien einer Tas2r131 [-/-]-Maus zeigten eine auffällige Expression des Reportergens im *cytoplasmic droplet*, einer Struktur mit bislang unklarer Funktion [F; Pfeil]. In blau dargestellt sind Zellkerne, die mit TO-PRO-3 angefärbt wurden. Einzelne Hodentubuli wurden durch eine Umrandung hervorgehoben. LZ: Leydig Zelle; SZ: Sertoli Zelle. Maßstab: 100 μ m (Hoden), 10 μ m (Spermien).

Gen-defiziente Mäuse für α -Gustducin und den Tas1r3 zeichnen sich bezüglich der Hoden- und Spermienmorphologie durch veränderte Spermienkopfformen und zelluläre Auffälligkeiten in einzelnen *Tubuli seminiferi* aus (Mosinger et al., 2013; Xie et al., 2014). Daher stellte sich für die fast kongene Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Mauslinie die Frage, ob die Deletion der Tas2r131-codierenden Sequenz zu einer veränderten Morphologie des Hodengewebes bzw. der männlichen Keimzellen führt. In morphometrischen Analysen, die die Gesamtanzahl der Hodentubuli sowie den Tubulusdurchmesser einschlossen, wurde zusätzlich die Apoptoserate in Tas2r131-defizienten Hodengewebe bestimmt. Zur Untersuchung der *Tubuli seminiferi*-assoziierten morphologischen Parameter wurden Paraffinschnitte von isolierten Hoden angefertigt und eine Übersichtsfärbung nach dem Hämatoxylin-Eosin Färbeverfahren, mit dem Zellkerne und zytoplasmatische Bestandteile dargestellt werden, durchgeführt (siehe 3.4.1.1.1). Von sieben Geschwisterpaaren wurde pro Tier die Gesamtanzahl der Hodentubuli in jeweils vier verschiedenen Hodenschnitten unterschiedlicher Schnittebenen ausgezählt. Die mittlere Anzahl der gesamten Tubuli basierte

auf den sieben Mittelwerten jeden Genotyps und war für Tas2r131 [-/-]-Männchen ($220,4 \pm 13,7$ Tubuli) gegenüber Tas2r131 [+/+]-Männchen ($244,4 \pm 7,9$ Tubuli) signifikant verringert (Abbildung 17; Tubulianzahl; paariger T-Test: $p = 0,004$). Da in Tas2r131-defizienten Gewebeschnitten des Hodens keine vergrößerten Interstitialräume aufgefallen sind, konnten daher eventuell größere Tubulidurchmesser erwartet werden. An Hodenschnitten von fünf Geschwisterpaaren der untersuchten Tiere wurden daher die mittleren Tubulidurchmesser über ein rechtwinklig angelegtes Fadenkreuz bestimmt. Pro Tier wurden erneut jeweils vier Hodenschnitte unterschiedlicher Schnittebene verwendet und pro Gewebeschnitt fünf Tubuli bezüglich ihres Durchmessers vermessen. Aus 100 analysierten Tubuli wurde der Mittelwert gebildet und daraus abgeleitet, dass die Samenanälchen der Tas2r131-defizienten Männchen einen größeren Durchmesser hatten, als ihre Tas2r131 Wildtyp-Geschwister (Tas2r131 [+/+]: $171,3 \pm 11,1 \mu\text{m}$; Tas2r131 [-/-]: $173,7 \pm 9,9 \mu\text{m}$). Analysen mit dem paarigen T-Test ergaben keine statistisch signifikante Abweichung (Abbildung 17; Tubulidurchmesser; $p = 0,403$).

Störungen in der zellulären Kommunikation aufgrund des Fehlens eines Mitglieds einer wichtigen Signalkaskade, können zum Fehlverhalten der Zelle und damit zur apoptotischen Reaktion führen. Als Apoptose wird der programmierte Zelltod einer einzelnen Zelle bezeichnet. Durch äußere, wie auch intrazelluläre Auslöser kann die komplexe Signalkaskade, die zur Apoptose führt, induziert werden, woraus u. a. der Abbau der DNA der betroffenen Zelle resultiert (Kerr et al., 1972). Auch während der Spermatogenese kann es zu apoptotischen Ereignissen kommen, die zur Aussortierung von Keimzellen führt. Eine verstärkte Apoptoserate in Gewebeschnitten von heterozygoten Tas2r131-Hoden könnte daher einen Hinweis auf die Ursache der beobachteten Genotypverschiebung (Abbildung 14 A) geben, weswegen die testikuläre Apoptoserate erfasst wurde. Die quantitative Bestimmung apoptotischer Zellen in Hodengewebe wurde anhand von Paraffinschnitten unter Verwendung des *In situ cell death detection Kit, TMR red* (Roche) durchgeführt (siehe 3.4.1.3). Hierbei wurden von sieben Geschwisterpaaren jeweils vier Hodenschnitte unterschiedlicher Schnittebenen analysiert. An einem Fluoreszenzmikroskop wurde die Anzahl an Hodentubuli über vier gleichgroße Blickfelder in einem Gewebeschnitt ermittelt. Anschließend wurden die rot-fluoreszierenden, apoptotischen Ereignisse pro Tubulus gezählt und ins Verhältnis zur Anzahl der Hodentubuli in den gleichen vier Blickfeldern gesetzt. Die Gesamtdaten aller apoptotischen Tas2r131 [+/+]-Untersuchungen ($0,5 \pm 0,1$ apoptotische Zellen/Tubulus) wurden mit Hilfe des paarigen T-Tests mit den Daten der Untersuchungen an Hodenschnitten von Tas2r131 [-/-]-Tieren ($0,6 \pm 0,1$ apoptotische Zellen/Tubulus) verglichen. Die Häufigkeit auftretender apoptotischer Ereignisse in einem Hodentubulus ist statistisch nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 17, apoptotische Zellen/Tubulus; $p = 0,641$).

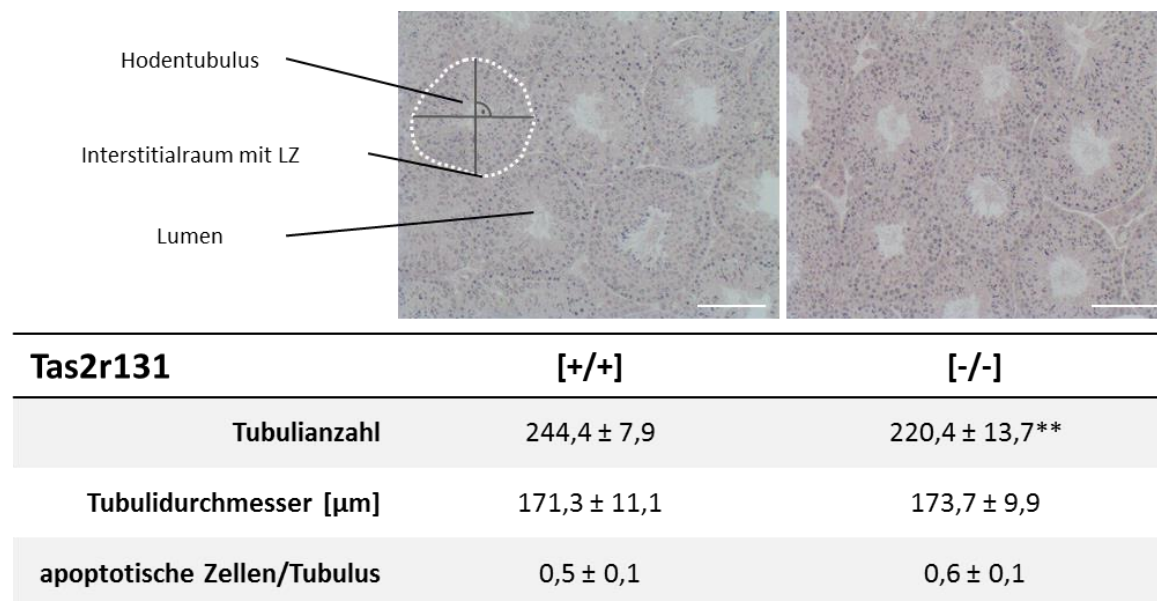


Abbildung 17: Quantitative Analysen zur Hodenmorphologie von Tas2r131-defizienten Männchen. Anhand HE-gefärbter Paraffinschnitte des Hodens (3 µm) von Tas2r131 [+/+] und Tas2r131 [-/-]-Mäusen wurden die Gesamtzahl an Tubuli und ihr Durchmesser ermittelt. Die bestimmte Tubulianzahl von sieben Geschwisterpaaren (N6) war in Tas2r131 [-/-]-Mäusen signifikant erniedrigt (paariger T-Test, $p = 0,0042$). Von fünf Geschwisterpaaren wurden die mittleren Durchmesser von jeweils 100 Hodenkanälchen (*Tubuli seminiferi*) über ein rechtwinkliges Fadenkreuz vermessen. Zwischen den Tubulidurchmessern beider Genotypen war kein signifikanter Unterschied festzustellen ($p = 0,403$). An ungefärbten Paraffin-Hodenschnitten von sieben Geschwisterpaaren (N6) wurde ein Versuch zur Darstellung apoptotischer Ereignisse durchgeführt und rot-fluoreszierende, apoptotische Zellen quantitativ in Bezug auf die gleichzeitig bestimmte Hodentubulianzahl ermittelt. Die gemittelten Werte ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen Tas2r131 [+/+] und Tas2r131 [-/-] ($p = 0,641$). Über der Tabelle sind exemplarische Aufnahmen HE-gefärbter Paraffinschnitte des Hodens und ein Fadenkreuz, wie es für die Bestimmung der mittleren Tubulidurchmesser verwendet wurde, abgebildet (links: Tas2r131 [+/+], rechts Tas2r131 [-/-]). Maßstab: 25 µm. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM; $p \leq 0,05$ * und $p \leq 0,01$ **.

Zusätzlich zur Untersuchung des testikulären Tas2r131 [-/-]-Gewebes wurde die Morphologie der Spermien von fünf Tas2r131-Geschwisterpaaren ([+/+] und [-/-]; N6) analysiert (siehe 3.4.1.2) und mit den Ergebnissen verglichen, die Frau Dr. Dorke Meyer in ihrer Dissertation mit Tieren der ersten Rückkreuzungsgeneration erhalten hat. Die detaillierte Betrachtung der Spermien erfolgte durch eine Vermessung der Spermienköpfe hinsichtlich der vier Parameter: gerade Kopflänge (I), gerade Akrosomlänge (II), Umfang (III) und Fläche (IV) (Abbildung 18). Dazu wurden die epididymalen Spermien auf Objektträgern ausgestrichen und zur Kontrastierung der subzellulären Strukturen mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt. Anhand mikroskopischer Aufnahmen und der Cell^A-Software (Olympus, Hamburg) wurden die vier Parameter für jeweils 50 Spermien eines Genotyps (pro Genotyp je zehn Spermien von fünf Männchen) bestimmt. Mit dem paarigen T-Test wurden die gemessenen Größen miteinander verglichen und auf eine vorliegende Signifikanz hin geprüft. Die geraden Längen des Spermienkopfes (Parameter I und II) waren durch die Deletion der Tas2r131-codierenden Sequenz unverändert (Abbildung 18; Tas2r131 [+/+] I: $7,2 \pm 0,1$ µm; II: $7,4 \pm 0,1$ µm; Tas2r131 [-/-] I: $7,2 \pm 0,1$ µm $p = 0,661$; II: $7,3 \pm 0,1$ µm $p = 0,703$), jedoch waren sowohl der Umfang (III), als auch die Fläche (IV) des Kopfes in Tas2r131 [-/-]-Spermien signifikant vergrößert (Abbildung 18; Tas2r131 [+/+] III: $22,2 \pm 0,2$ µm; IV: $18,7 \pm 0,2$ µm²; Tas2r131 [-/-] III: $22,9 \pm$

0,2 μm $p = 0,001$; IV: $19,9 \pm 0,4 \mu\text{m}^2$ $p = 0,0006$). Diese Auffälligkeit konnte in Spermien von Tas2r131 [-/-]-Männchen der ersten Rückkreuzungsgeneration nicht festgestellt werden.

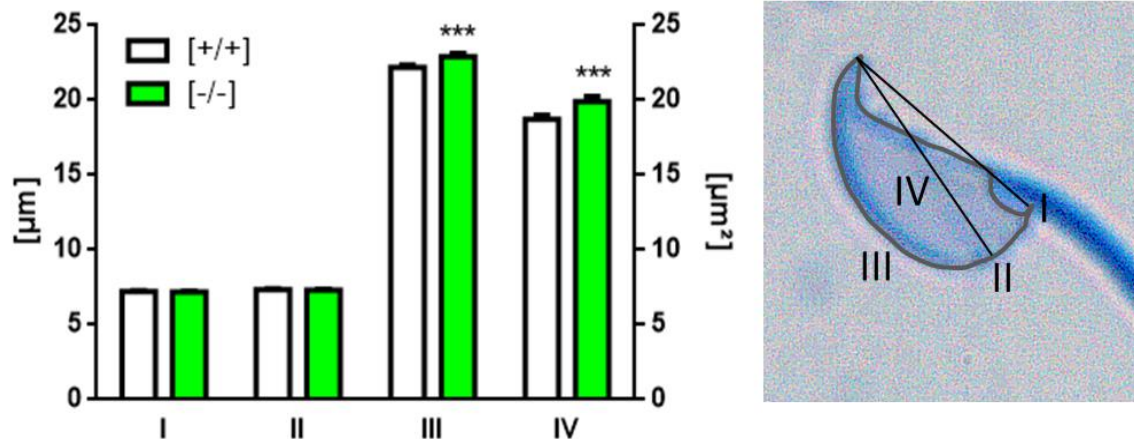


Abbildung 18: Vermessung Spermienkopf-bezogener Morphologieparameter an Tas2r131-defizienten Spermien. Zur Erfassung morphologischer Anomalien an epididymalen Spermien von fünf Tas2r131-Geschwisterpaaren (N6) wurden die Spermien auf einem Objektträger ausgestrichen und mit Coomassie angefärbt. Anhand von mikroskopischen Aufnahmen wurden die Parameter gerade Kopfänge (I), gerade Akrosomlänge (II), Umfang (III) und Fläche (IV) computergestützt bestimmt. Pro Genotyp wurden 50 Spermien von fünf Männchen vermessen, und die Ergebnisse mit Hilfe des paarigen T-Tests statistisch ausgewertet. Zwischen den Parametern I und II konnte kein Unterschied zwischen den Geschwisterpaaren festgestellt werden, wohingegen der Umfang und die Fläche der Tas2r131 [-/-]-Spermienköpfe signifikant vergrößert waren (III $p = 0,0013$; IV $p = 0,0006$). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM; $p \leq 0,05$ *).

Neben der geschlechtsspezifischen Genotypverschiebung unter Nachkommen von Zuchtpaaren mit einem Tas2r131 [+/-]-Weibchen und einem Tas2r131 [+/-]-Männchen wurde ein weiterer Tas2r131-relevanter Befund von Frau Dr. Dorke Meyer in ihrer Dissertation beschrieben: die signifikant erhöhte Spermienanzahl in Tas2r131-defizienten Männchen der ersten Rückkreuzungsgenerationen (N2-5) (Meyer, 2013). Um zu überprüfen, ob sich der genetische Hintergrund neben der veränderten Spermienkopfgröße auch auf die Anzahl der Spermien auswirkte, wurden Spermienanzahl, Körper- und Hodengewicht (siehe 3.2.3) sowie die Serumkonzentration des spermienbildenden Hormons Testosteron (siehe 3.4.6) von 16 Tas2r131-Geschwisterpaaren mit N6-Hintergrund bestimmt. Die ermittelten Werte wurden anschließend mit Hilfe des paarigen T-Tests statistisch miteinander verglichen. In Geschwisterpaaren mit einem N6-Hintergrund konnte im Gegensatz zu vorangegangenen Rückkreuzungsgenerationen bezüglich der Spermienanzahl keine signifikante Erhöhung in Tas2r131 [-/-]-Männchen festgestellt werden, sondern nur ein marginaler Unterschied zwischen Tas2r131 [+/-]- und Tas2r131 [-/-]-Männchen (Tabelle 7: Tas2r131 [+/-]: $33,3 \pm 1,6 \cdot 10^6$ Spermien; Tas2r131 [-/-]: $32,7 \pm 2,6 \cdot 10^6$ Spermien; $p = 0,853$). Das Körpergewicht der Geschwisterpaare war ebenfalls nicht signifikant verschieden ($p = 0,204$), wohingegen die Hoden der Tas2r131-defizienten Männchen leichter waren, als die der Tas2r131 [+/-]-Männchen (Tabelle 7). Da das verringerte Hodengewicht in Tas2r131 [-/-]-Männchen jedoch nicht signifikant abweichend von dem Gewicht der Tas2r131 [+/-]-Hoden war ($p = 0,318$), wurde das relative Hodengewicht bestimmt, indem der Quotient aus dem Hoden- und dem Körpergewicht gebildet wurde. Auf diese Weise war es möglich festzustellen, ob sich das Hodengewicht

proportional zum Körpergewicht veränderte, oder ob die Deletion der Tas2r131-codierenden Sequenz ausschließlich Auswirkungen auf das Hodengewicht hatte. Der Vergleich zeigt nahezu gleiche relative Hodengewichte in Tas2r131-Geschwisterpaaren und verdeutlicht, dass das leicht reduzierte Hodengewicht in Tas2r131 [-/-]-Männchen mit einem verringerten Körpergewicht einhergeht (Tabelle 7).

Ein für die Spermatogenese wichtiges Hormon ist das Sexualhormon Testosteron. Aufgrund der testikulären Lokalisation des Tas2r131-hrGFPs in Stadien der Spermatozyten und Spermatiden (Abbildung 16) und dem bekannten Einfluss von Geschmacksrezeptoren auf die Hormonausschüttung im Gastrointestinaltrakt (Dotson et al., 2008; Kokrashvili et al., 2009a; Kokrashvili et al., 2014; Prandi et al., 2013; Sternini et al., 2008), war es wichtig zu untersuchen ob eine Deletion des Bitterrezeptors Auswirkungen auf die Testosteronkonzentration in einer männlichen Maus hatte. Aufgrund des bekannten circadianen Rhythmus des Serum-Testosteronspiegels wurden die Serumproben immer zur gleichen Tageszeit gewonnen (Plymate et al., 1989) (siehe 3.2.4). Mittels eines kompetitiven *Testosterone ELISA Kits* (Cayman Chemical) wurde die Testosteronkonzentration von sieben Tas2r131 [+/+]- bzw. acht Tas2r131 [-/-]-Männchen (N6) bestimmt (siehe 3.4.6) und die Signifikanz mit Hilfe des unpaarigen T-Tests berechnet. Dabei wurde festgestellt, dass in Rezeptor-defizienten Männchen weniger Testosteron im Blut nachgewiesen werden konnte ($318,9 \pm 56,8$ pg/ml), dass dies aber im Vergleich zu Tas2r131 [+/+]-Männchen ($410,8 \pm 99,3$ pg/ml) nicht statistisch unterschiedlich war ($p = 0,440$) (Tabelle 7). Um die bisher um ca. 22 % voneinander abweichende Testosteronkonzentration in Tas2r131-Geschwistertieren zu verifizieren und möglicherweise sogar einen signifikanten Unterschied festzustellen, werden weitere hormonelle Untersuchungen von Tas2r131-Männchen benötigt.

Um zu überprüfen, ob sich das leicht reduzierte Testosteronlevel in Tas2r131 [-/-]-Männchen auch in der Spermienanzahl der Männchen niederschlägt, wurde die Gesamtspermienanzahl epididymaler Spermien der für die Testosteronbestimmung eingesetzten Männchen bestimmt (siehe 3.2.3). Der Unterschied in der Testosteronkonzentration spiegelte sich tatsächlich in den Spermienanzahlen beider Genotypen wider: Die homozygot defizienten Tas2r131-Männchen bilden etwa $28,8 \pm 3,7 \cdot 10^6$ Spermien, während die Tas2r131 [+/+]-Männchen $31,9 \pm 2,8 \cdot 10^6$ Spermien produzierten. Der Unterschied konnte allerdings mittels T-Test nicht als signifikant bewertet werden ($p = 0,526$) (Daten nicht gezeigt).

Während in Tas2r131-defizienten Männchen der ersten Rückkreuzungsgenerationen noch eine signifikant erhöhte Spermienanzahl gegenüber Tas2r131 [+/+]-Geschwistern festgestellt wurde (Meyer, 2013), konnte zwischen Tas2r131-Geschwistern der N6-Generation weder ein Unterschied in der Spermienanzahl, noch in den weiteren untersuchten Parametern (Hodentubulianzahl, Tubulidurchmesser, testikuläre Apoptoserate) registriert werden. Die Ursprungshypothese, dass die beobachtete Genotypverschiebung unter Nachkommen von Verpaarungen mit einem Tas2r131 [+/+]-Weibchen und einem Tas2r131 [+/-]-Männchen möglicherweise mit der erhöhten Spermienanzahl in Tas2r131-defizienten Männchen zu erklären ist, konnte damit widerlegt werden. Auch die Annahme, dass der angestiegenen Häufigkeit heterozygoter Nachkommen in den beschriebenen Verpaarungen eine größere Tas2r131 [-]-Subpopulation unter Spermien von Tas2r131 [+/-]-Männchen zugrunde liegt, konnte nicht bestätigt werden: Eine Genotypverschiebung zugunsten homozygot defizienter Nachkommen zeigte sich auch in Zuchtpaaren mit einem Tas2r131 [+/-]-Weibchen und einem

Tas2r131 [-/-]-Männchen, jedoch nicht in Zuchtpaaren mit einem Tas2r131 [-/-]-Weibchen und einem Tas2r131 [+/-]-Männchen.

Tabelle 7: Auswirkung der Tas2r131-Defizienz auf das Körper- und Hodengewicht sowie die Spermienanzahl und Serumtestosteronkonzentration von männlichen Mäusen. Von 16 Geschwisterpaaren (N6) der Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Mauslinie wurde direkt nach zervikaler Dislokation das Körpergewicht und das Gewicht beider Hoden bestimmt, woraus das relative Hodengewicht berechnet werden konnte. Zur Bestimmung der Spermienanzahl wurden beide caudalen Nebenhodenabschnitte in eine Petrischale mit 2 ml HS-Puffer überführt und einige Male eingeschnitten, so dass die motilen Spermien bei 37 °C herausschwimmen konnten. Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses des Tas2r131-Rezeptors auf das Sexualhormon Testosteron wurde von sieben Tas2r131 [+/-]- und acht Tas2r131 [-/-]-Männchen Blut entnommen, und anschließend das Serum daraus gewonnen. Das Hormon wurde über eine Chloroform-Extraktion in die wässrige Phase gebracht und diese in einer Dreifachbestimmung in einem kompetitiven ELISA (*Testosterone ELISA Kit*; Cayman Chemical) eingesetzt. Anhand eines mitgelieferten internen Standards wurde dann aus den gemessenen Absorptionswerten die Konzentration des Testosterons im Serum ermittelt. Tas2r131 [-/-]-Männchen zeigten eine geringere Testosteronkonzentration im Blut als Tas2r131 [+/-]-Männchen. Durch den Vergleich der Testosteron-Messwerte mit Hilfe eines unpaarigen T-Tests konnte der Konzentrationsunterschied des Testosterons im Serum in beiden Genotypen jedoch nicht als signifikant bewertet werden (unpaariger T-Test, $p = 0,440$). Die bestimmten Werte der untersuchten Parameter von Tas2r131 [+/-]- und [-/-]-Männchen wurden über den paarigen T-Test statistisch untersucht. Für Tas2r131-defiziente Männchen konnte in keiner der analysierten Größen eine signifikante Abweichung zum Tas2r131 [+/-] gezeigt werden ($p > 0,05$). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM; $p \leq 0,05$ *.

Tas2r131	+/+	-/-
Spermienanzahl [$\cdot 10^6$]	33,3 \pm 1,6	32,7 \pm 2,6
Körpergewicht [g]	28,6 \pm 0,8	27,6 \pm 0,6
Hodengewicht [mg]	194 \pm 7,1	183 \pm 6,5
rel. Hodengewicht [%]	0,7 \pm 0,8	0,7 \pm 0,02
Testosteron [pg/ml]	410,8 \pm 99,3	318,9 \pm 56,8

4.1.4 Analyse der Akrosomreaktion in Tas2r131-defizienten Spermien

Bei einer erfolgreichen Befruchtung der Eizelle durch ein Spermium muss dieses zuvor die dichte Glykoproteinmatrix der Oozyte durchdrungen haben. Für diesen Vorgang kann das Spermium über einen Exozytose-Prozess, die Akrosomreaktion, hydrolytische Enzyme aus dem Akrosom freisetzen, die die Eihülle abbauen und so die Barriere der weiblichen Keimzelle partiell entfernen (Bleil and Wassarman, 1983; Buffone et al., 2009). Für eine erfolgreiche Akrosomreaktion sind unter anderem die *second messenger* Ca^{2+} und cAMP (Breitbart and Spungin, 1997) sowie eine normale Spermienkopfmorphologie (Liu and Baker, 1998; Oehninger et al., 1994) notwendig. Da in den zuvor beschriebenen Ergebnissen beschrieben wurde, dass Tas2r131-defiziente Spermien im Vergleich zu Tas2r131 [+/-]-Spermien einen größeren Kopf (Abbildung 18) haben, und Tas2r131-defiziente Spermien aufgrund der beobachteten Genotypverschiebung eventuell leichter einer Eizelle befruchten können, war es wichtig herauszufinden, ob der Ablauf der komplexen Akrosomreaktion in Tas2r131-defizienten Spermien verändert war.

Hierfür wurde vorerst geprüft, ob die Fusionsmaschinerie der Spermien, die für die Exozytose des akrosomalen Vesikels essentiell ist, korrekt abläuft, indem Tas2r131 [+]- und Tas2r131 [-]-Spermien nach 90 min Inkubation in einem Kapazitierungsbuffer (bei 37 °C mit 5 % CO₂) mit dem Ca²⁺-Ionophor A23187 stimuliert wurden (siehe 3.4.2). A23187 bildet Poren in der Plasmamembran, die u. a. für Ca²⁺-Ionen durchlässig sind, so dass es bei der Inkubation der Spermien mit dem A23187 zu einem Ca²⁺-Einstrom in die Zelle und damit zur maximal möglichen Akrosomreaktion kommt (Malaisse, 1988). Als Negativkontrolle wurde parallel zur A23187-Stimulationsprobe eine Probe zur Lösungsmittelkontrolle von A23187 angesetzt, indem die Spermien in 0,1 % DMSO inkubiert wurden. Anschließend wurden die Spermienpräparate einer Coomassiefärbung unterzogen, die bei Spermien mit intaktem Akrosom zu einer blauen Färbung des Spermienkopfes führt. Die Spermien ohne bzw. mit intaktem Akrosom konnten so gezählt und der Anteil Akrosom-reagierter Spermien (Exozytoserate) berechnet werden. Die Differenz aus Exozytoseraten der A23187- und der DMSO-Stimulationsansätze gab dann die A23187-Induktion an. Dieser Prozentsatz zeigte an, wie stark das Ca²⁺-Ionophor eine Akrosomreaktion in den Spermien induzieren konnte.

Ein funktionierender Ablauf der Akrosomreaktion kann durch eine A23187-Stimulation in Tas2r131 [+]- und Tas2r131 [-]-Spermien festgestellt werden. Durch die Berechnung der mittleren A23187-induzierten Akrosomreaktion in Tas2r131-defizienten Spermien und der Vergleich der A23187-Induktionsrate in Tas2r131 [+]-Spermien wurde deutlich, dass der Bitterrezeptor keinen Einfluss auf den Ablauf der Akrosomreaktions-Maschinerie zu haben scheint (Abbildung 19 A; Tas2r131 [+/+]: 24,9 ± 3,8 %; Tas2r131 [-/-]: 25,2 ± 3,1 %, unpaariger T-Test: p = 0,95).

Während der Durchquerung des weiblichen Genitaltrakts zur Oozyte oder der *in vitro* Kapazitierung können Spermien aber auch spontan, also ohne einen Stimulus ihr Akrosom verlieren und dadurch ihre Fähigkeit die Eihülle zu durchdringen einbüßen (Klemm and Engel, 1991; Visconti et al., 1999). Nachdem eine Beeinträchtigung der Fusionsmaschinerie der Akrosomreaktion in Tas2r131-defizienten Mäusen ausgeschlossen werden konnte, wurde überprüft, ob das Fehlen des Bitterrezeptors zu einer vermehrt spontanen Akrosomreaktion führt. Deswegen wurden die spontanen Akrosomreaktionsraten in unkapazitierten und kapazitierten Tas2r131 [+]- (sechs Männchen) und [-]- (13 Männchen) Spermien bestimmt. Abbildung 19 B zeigt die deutliche Zunahme der spontanen Akrosomreaktionsrate in kapazitierten Spermien beider Tas2r131-Genotypen, wie sie aus der Literatur bekannt ist (Inoue et al., 2003; Klemm and Engel, 1991; Mortimer et al., 1989; Oehninger et al., 1994; Visconti et al., 1999). Wurde die Auswirkung des Kapazierungsstatus in Tas2r131 [+]- und [-]-Spermien isoliert betrachtet, fiel auf, dass die spontane Exozytoserate in unkapazitierten Tas2r131-defizienten Spermien geringfügig, jedoch nicht signifikant verringert war (Tas2r131 [+/+]: 5,9 ± 1,7 %; Tas2r131 [-/-] 3,9 ± 0,8 %; unpaariger T-Test: p = 0,330). Dieser Unterschied war im kapazitierten Zustand der Spermien nicht mehr zu sehen (Tas2r131 [+/+]: 18,7 ± 4,3 %; Tas2r131 [-/-] 20,6 ± 2,6 %; unpaariger T-Test: p = 0,708).

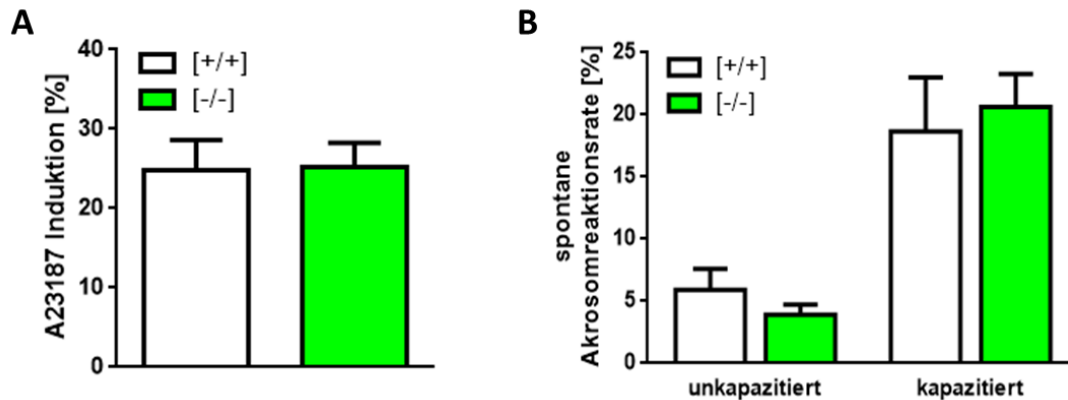


Abbildung 19: Quantitative Untersuchung der A23187-induzierten und spontanen Akrosomreaktion in Tas2r131-defizienten Spermien. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der komplexen Fusionsmaschinerie der Akrosomreaktion wurden *in vitro* kapazitierte epididymale Tas2r131 +/+ und -/- Spermien mit dem Ca^{2+} -Ionophor A23187 inkubiert und anschließend die Akrosomreaktionsrate bestimmt. Unspezifische Effekte des Lösungsmittels DMSO wurden in einem parallel mitgeführten Versuchsansatz quantitativ erfasst und von dem Wert der A23187-Auszählung abgezogen (= A23187-Induktion). Sowohl in Tas2r131 +/+ als auch in Tas2r131 -/- Spermien konnte mit A23187 eine Akrosomreaktion ausgelöst werden. Die Werte der berechneten A23187-Induktion unterscheiden sich jedoch nicht zwischen Spermien der beiden Tas2r131-Genotypen **[A]**. Die spontane Akrosomreaktionsrate in unkapazitierten und *in vitro* kapazitierten Tas2r131 +/+ und -/- Spermien wurde anhand von fixierten und Coomassie-gefärbten Spermienausstrichen quantitativ erhoben. In unkapazitierten Tas2r131 -/- Spermien war eine etwas reduzierte, jedoch nicht signifikant veränderte spontane Akrosomreaktionsrate zu beobachten (unpaariger T-Test; $p = 0,330$). Durch den Kapazitierungsverfahren war ein deutlicher Anstieg der spontanen Akrosomreaktionsrate in Spermien von Tas2r131 +/+ und Tas2r131 -/- Männchen festzustellen. Der im unkapazitierten Zustand ermittelte Unterschied in der spontanen Exozytoserate von Tas2r131 -/- Spermien wurde in den kapazitierten Spermien nicht mehr erkannt **[B]**. In die Auswertung der Versuche gingen ausschließlich Datensätze von Mäusen ein, deren A23187-abhängige Akrosomreaktionsrate mindestens 10 % über der DMSO-induzierten Akrosomreaktionsrate lag (Tas2r131 +/+: 6 Männchen; Tas2r131 -/-: 13 Männchen). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM; $p \leq 0,05$ *.

Durch diese Ergebnisse konnte belegt werden, dass die Tas2r131-Defizienz keinen Einfluss auf die Akrosomreaktions-Fusionsmaschinerie und die spontane Akrosomreaktionsrate der untersuchten Spermien hat und daher nicht die Ursache für die beobachtete Genotypverschiebung sein kann. Jedoch ist es wichtig zu bedenken, dass die Experimente *in vitro* durchgeführt wurden und ein künstlicher Stimulus (A23187) als Indikator für einen intakten Akrosomreaktions-Ablauf fungierte. Um zu überprüfen, ob die A23187-verursachte freie Verfügbarkeit von Ca^{2+} im Zytoplasma der Spermien möglicherweise Tas2r131-regulierte Signalvorgänge in Tas2r131-defizienten Spermien überlagert, wurden Tas2r131 +/+ und Tas2r131 -/- Spermien mit dem physiologischen Stimulus, der *Zona pellucida*, stimuliert. Für die Isolation der *Zonae pellucidae* wurden Ovarien von Balb/C-Mäusen entnommen und die *Zonae* mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation angereichert und anschließend solubilisiert (Buffone et al., 2009) (siehe 3.4.3). In parallelen Ansätzen wurden sowohl Tas2r131 +/+, als auch -/- Spermien mit isolierten *Zonae pellucidae* und dem *Zona*-Isolierungspuffer als Negativkontrolle inkubiert, und anschließend die akrosomale Exozytoserate bestimmt. Ähnlich der Berechnung der A23187-Induktion wurde die Differenz der Akrosomreaktionsraten von *Zonae*- oder Puffer-stimulierten Spermien gebildet und als *Zona*-Induktion bezeichnet. Die berechneten *Zona*-Induktionsraten von Spermien von drei Tas2r131 +/+ und sieben Tas2r131 -/- Männchen wurden über einen unpaarigen statistischen T-Test miteinander verglichen. Die Induktion der Akrosomreaktion durch isolierte *Zonae* war in Tas2r131 -/- Spermien höher ($7,1 \pm$

4,0 %) als in Tas2r131 [+/+]-Spermien ($3,0 \pm 4,0$ %), jedoch nicht statistisch signifikant unterschiedlich (unpaariger T-Test: $p = 0,498$) (Abbildung 20). Aufgrund erheblicher Schwankungen bei den quantifizierten Exozytoseraten in beiden Spermienpopulationen und der Divergenz hinsichtlich der eingesetzten Versuchstiere, sind weitere Untersuchungen zur *Zona pellucida*-induzierten Akrosomreaktion in Tas2r131-defizienten Spermien notwendig. Sollte die erhöhte *Zona*-Induktionsrate in Tas2r131-defizienten Spermien weiterhin bestätigt werden können, wäre es möglich, dass die beobachtete Genotypverschiebung (Abbildung 14) durch eine höhere Empfindlichkeit der Tas2r131-defizienten Spermien gegenüber der zu befruchtenden Eizelle erklärt werden könnte.

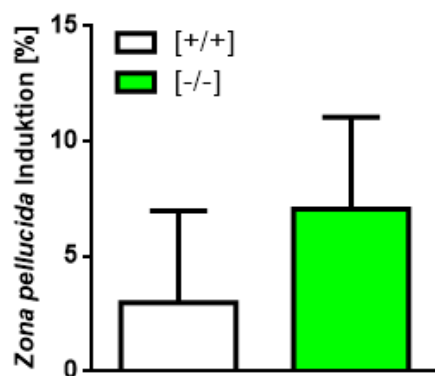


Abbildung 20: Quantifizierung der *Zona pellucida*-induzierten Akrosomreaktion in Tas2r131-defizienten Spermien. Für die Untersuchung einer möglichen Veränderung der *Zona pellucida*-induzierten Akrosomreaktionsrate von Tas2r131-defizienten Mäusen wurden Tas2r131 [+/+]- und Tas2r131 [-/-]-Spermien mit solubilisierter *Zona pellucida* stimuliert. Die quantifizierten Exozytoseraten von parallel angesetzten und mit *Zona*-Isolierungspuffer stimulierten Spermien wurden von den *Zona*-induzierten Akrosomreaktionsraten subtrahiert und dadurch die Induktion durch die *Zona pellucida* berechnet. Es zeigt sich, dass die durch die *Zona pellucida* hervorgerufene Akrosomreaktionsrate in Tas2r131-defizienten Spermien erhöht ist (unpaariger T-Test: $p = 0,498$). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei Tas2r131 [+/+]- und sieben Tas2r131 [-/-]-Männchen; $p \leq 0,05$ *.

4.1.5 Intrazelluläre Konzentration von Signalbotenstoffen in Spermien

Spermien haben die Besonderheit, dass sie kaum Proteinbiosynthese betreiben und molekulare Abläufe von post-translationalen Modifikationen abhängig sind (Aitken and Baker, 2008; Rahman et al., 2013). Derartige Modifikationen können sich auf intrazelluläre Signalwege auswirken und somit Einfluss auf zellinterne Reaktionen des Spermiums haben. Da aus der Geschmacksrezeptorsignalkaskade bekannt ist, dass eine Signalweiterleitung über die sekundären Botenstoffe Ca^{2+} und cAMP erfolgt, und beide Moleküle in ihrer Konzentration in Tas1r1-defizienten Spermien erhöht sind (Meyer et al., 2012), war es von großem Interesse zu prüfen, ob eine ähnliche Veränderung für Tas2r131-defiziente Spermien vorliegt.

Für die Bestimmung des basalen, intrazellulären Ca^{2+} -Levels wurden von jeweils sechs Tas2r131 [+/+]- und Tas2r131 [-/-]-Geschwistertieren epididymale Spermien isoliert und entweder unkapazitiert oder *in vitro* kapazitiert eingesetzt (siehe 3.4.4). Die Spermien wurden mit dem membrangängigen Ca^{2+} -Indikator Fura-2AM beladen und anschließend auf ein Deckgläschen getropft (siehe 3.4.4.2). Dann wurden die angehefteten Spermien abwechselnd mit unterschiedlichen Wellenlängen (340 nm und 380 nm) belichtet. Anhand der gemessenen Fluoreszenzsignale des Ca^{2+} -sensitiven Fura-2AM Farbstoffs im Spermienkopf, konnte die basale intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration in den ersten zehn Messsekunden ratiometrisch bestimmt werden (Grynkiewicz et al., 1985). Der Einschluss von Messdaten von avitalen Spermien wurde ausgeschlossen, indem eine Positiv- bzw. Vitalitätskontrolle mit dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin durchgeführt wurde, mit dem die Spermien im Anschluss an die Messperiode inkubiert wurden.

Die Vitalität der analysierten Spermien zeigte sich unmittelbar nach der Ionomycin-Behandlung durch einen Ca^{2+} -Influx und einem daraus resultierenden starken Anstieg der Fura-2-Ratios (Ruknudin and Silver, 1990; Sanchez-Cardenas et al., 2014). In die anschließende Auswertung wurden ausschließlich basale Ca^{2+} -Messwerte von Spermien einbezogen, die deutlich (50 % über den Basalwert) auf den Ionomycin-Stimulus reagierten. Wie aus der Literatur bekannt ist, steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration während der Kapazitierung an (Breitbart, 2002a; Ruknudin and Silver, 1990). Der Vergleich der berechneten Mittelwerte der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen in unkapazitierten und kapazitierten Spermien zeigte, dass das ansteigende Ca^{2+} -Level tatsächlich in den kapazitierten Spermien zu erkennen war (Abbildung 21 A). Vergleicht man nun unkapazitierte Tas2r131 [-/-]-Spermien mit Tas2r131 [+/-]-Spermien, konnte eine leicht reduzierte Ca^{2+} -Konzentration in Tas2r131-defizienten Spermien bestimmt werden, die durch eine Berechnung mit dem paarigen statistischen T-Test jedoch nicht als signifikant abweichend bewertet werden konnte (Tas2r131 [+/-]: $0,257 \pm 0,007$; Tas2r131 [-/-]: $0,249 \pm 0,007$ p = 0,307). Dieses etwas unterschiedliche basale Ca^{2+} -Level in unkapazitierten Tas2r131-defizienten Spermien gegenüber Wildtyp-Spermien konnte in kapazitierten Spermien nicht mehr festgestellt werden (Tas2r131 [+/-]: $0,282 \pm 0,015$; Tas2r131 [-/-]: $0,279 \pm 0,010$ p = 0,737). Aufgrund der starken Streuung der Messwerte kapazitierter Tas2r131 [+/-]-Spermien sind in Abbildung 21 B die Mittelwerte aller Einzelzellmessungen unkapazitierter und kapazitierter Tas2r131-Spermien beider Genotypen abgebildet. Auch in dieser Form der Auswertung konnte der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in kapazitierten Spermien gegenüber den unkapazitierten Spermien registriert werden. In unkapazitierten Tas2r131 [-/-]-Spermien ist das reduzierte Ca^{2+} -Level gegenüber den unkapazitierten Tas2r131 [+/-]-Spermien deutlicher zu erkennen, jedoch nicht signifikant unterschiedlich (Tas2r131 [+/-]: $0,256 \pm 0,003$; Tas2r131 [-/-]: $0,248 \pm 0,002$; unpaariger T-Test: p = 0,077).

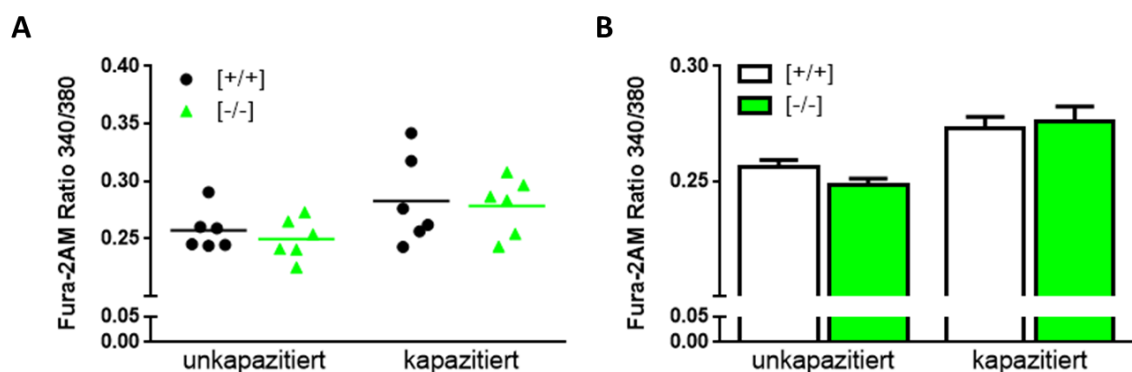


Abbildung 21: Ratiometrische Ca^{2+} -Konzentrationsbestimmungen an isolierten Tas2r131 [-/-]-Spermien mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2AM. Isolierte epididymale Spermien von sechs Tas2r131 [+/-]- und [-/-]-Geschwisterpaaren (N6) wurden unkapazitiert oder *in vitro* kapazitiert mit dem Ca^{2+} -Indikator Fura-2AM beladen. In den Köpfen der unbehandelten Spermien wurde anschließend die Fura-2AM Ratio der ersten zehn Messsekunden bestimmt. Bei der Analyse der Mittelwerte basaler Fura-2AM Ratios von sechs unabhängigen Versuchsdurchführungen war der auf den Kapazitierungsvorgang zurückzuführende Ca^{2+} -Anstieg in kapazitierten Tas2r131-Spermien beider Genotypen zu erkennen [A]. Im unkapazitierten Zustand der Tas2r131 [-/-]-Spermien kann ein leicht reduziertes Ca^{2+} -Level gegenüber Tas2r131 [+/-]-Spermien festgestellt werden. Dieser Unterschied ist in den kapazitierten Spermien nicht mehr vorhanden. Aufgrund der starken Streuung der kapazitierten Tas2r131 [+/-]-Fura-2AM Ratios werden in [B] die Mittelwerte aller Einzelzellmessungen gezeigt (unkapazitiert: Tas2r131 [+/-] 270 Zellen, Tas2r131 [-/-] 281 Zellen; kapazitiert: Tas2r131 [+/-] 224 Zellen, Tas2r131 [-/-] 212 Zellen). Der Kapazitierungsabhängige Ca^{2+} -Anstieg ist wieder deutlich darstellbar und die Reduzierung des Ca^{2+} -Levels in unkapazitierten

Tas2r131 [-/-]-Spermien klar ersichtlich. Der basale Ca^{2+} -Level-Unterschied in unkapazitierten Tas2r131 [+/+]- und [-/-]-Spermien ist nicht signifikant (unpaariger T-Test; $p = 0,077$). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM; $p \leq 0,05$ *.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Tas2r131-Defizienz keine signifikante Veränderung auf die Ca^{2+} -Konzentration in Spermien hervorruft, und dass sich deswegen die Funktion des Bitterrezeptors von der Funktion des Tas1r1 im männlichen Reproduktionsgewebe zu unterscheiden scheint (Meyer et al., 2012).

Da zusätzlich zum Ca^{2+} auch cAMP als sekundärer Botenstoff in der Geschmackssignalkaskade fungiert (Clapp et al., 2008) und Einfluss auf reproduktionsbiologische Vorgänge, wie die Kapazitierung hat (Meyer et al., 2012; Navarrete et al., 2015; Visconti et al., 1995b), wurde überprüft, ob die Tas2r131-Deletion Auswirkungen auf den intrazellulären cAMP-Haushalt hatte. Für die Bestimmung der basalen cAMP-Konzentration wurden unkapazitierte und *in vitro* kapazitierte Spermien von fünf Tas2r131 [+/+]- und [-/-]-Männchen verwendet und mit HS-Puffer bzw. IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin), einem Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitor, inkubiert (siehe 3.4.5). Anschließend wurden die intrazellulär ablaufenden Signalmechanismen in den Spermien durch das Schockgefrieren in flüssigen Stickstoff abgestoppt. Die Konzentrationsbestimmung von cAMP in den Spermien wurde unter Verwendung des kompetitiven *cAMP Biotrak EIA Kits* (GE Healthcare) durchgeführt. Hierfür war es zunächst notwendig das intrazelluläre und häufig an Proteine assoziierte cAMP über eine Chloroform-Trioctylamin Mischung (1:1) aus den Spermien zu extrahieren und in wässrige Lösung zu bringen (siehe 3.4.5.2). Die Absorption der vorbereiteten Tas2r131-Spermienproben wurde bei 450 nm gemessen und anschließend die Messwerte auf den mitgelieferten Messstandard bezogen, so dass die cAMP-Konzentrationen der einzelnen Proben quantifiziert werden konnten.

Im weiblichen Genitaltrakt kommt es durch eine erhöhte Hydrogencarbonat-Konzentration zur Aktivierung der löslichen Adenylatzyklase und dadurch zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration in Spermien (Eisenbach and Giojalas, 2006; Visconti et al., 2002). Dieser Prozess kann *in vitro* mittels eines Kapazitierungs-puffers nachgeahmt werden, so dass der Kapazitierungs-typische cAMP-Anstieg hervorgerufen wird. Die gemessene cAMP-Konzentration in Spermien beider Tas2r131-Genotypen war nach der Kapazitierung gegenüber den unkapazitierten Spermien erhöht (Abbildung 22 A). Die statistische Analyse der basalen cAMP-Konzentration beider Tas2r131-Genotypen zeigte sowohl für unkapazitierte als auch für *in vitro* kapazitierte Tas2r131-Spermien keinen signifikanten Unterschied (unkapazitiert: Tas2r131 [+/+] $194,97 \pm 29,73$ fmol/1 Mio. Zellen; Tas2r131 [-/-] $296,31 \pm 171,57$ fmol/1 Mio. Zellen $p = 0,552$; kapazitiert: Tas2r131 [+/+] $551,67 \pm 178,13$ fmol/1 Mio. Zellen; Tas2r131 [-/-] $495,85 \pm 113,83$ fmol/1 Mio. Zellen $p = 0,798$). Diese Ergebnisse zeigten, dass es, anders als bei der Deletion des Tas1r1, durch die Tas2r131-Deletion zu keiner veränderten Aktivität der Adenylatzyklen kam und daher eine cAMP-Synthese in Tas2r131 [-/-]-Spermien scheinbar uneingeschränkt verlief.

Um sicherzustellen, dass zusätzlich der cAMP-Abbau in Tas2r131 [-/-]-Spermien uneingeschränkt erfolgte, wurden unkapazitierte und *in vitro* kapazitierte Tas2r131 [+/+] und Tas2r131 [-/-]-Spermien mit IBMX behandelt, wodurch die PDE-abhängige cAMP-Hydrolyse inhibiert wurde. Aufgrund des blockierten katalytischen Umsatzes von cAMP in AMP durch IBMX stieg die cAMP-Konzentration unabhängig vom Tas2r131-Genotyp in unkapazitierten und in *in vitro* kapazitierten Spermien an (Abbildung 22 B; unkapazitiert: Tas2r131 [+/+] $399,52 \pm 100,32$ fmol/1 Mio. Zellen; Tas2r131 [-/-] $495,90 \pm 259,74$ fmol/1 Mio. Zellen $p = 0,730$; kapazitiert:

Tas2r131 $[+/-]$ $2127,81 \pm 857,11$ fmol/1 Mio. Zellen; Tas2r131 $[-/-]$ $1767,63 \pm 356,12$ fmol/1 Mio. Zellen $p = 0,657$). Diese Ergebnisse zeigten außerdem, dass zwischen den beiden untersuchten Tas2r131-Genotypen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der basalen cAMP-Konzentration festzustellen war. Da in *in vitro* kapazitierten Spermien grundsätzlich aufgrund des Hydrogencarbonats im Inkubationspuffer die cAMP-Konzentration stieg, entsprach es daher den Erwartungen, dass in IBMX-stimulierten und *in vitro* kapazitierten Tas2r131 $[+/-]$ - und Tas2r131 $[-/-]$ -Spermien die cAMP-Akkumulation zu erkennen war und die cAMP-Konzentration der unstimulierten Tas2r131 Spermien überstieg.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass in Tas2r131-defizienten Spermien (N6) keine deutlichen Veränderungen bezüglich der sekundären Botenstoffe Ca^{2+} und cAMP beobachtet und ein Kapazitierungs-abhängiger Anstieg beider Moleküle sowohl in Tas2r131 $[+/-]$ - als auch in Tas2r131 $[-/-]$ -Spermien verzeichnet werden konnte. Dadurch konnte eine erfolgreiche *in vitro* Kapazitierung abgeleitet und eine Auswirkung der Tas2r131-Deletion auf die Kapazitierung ausgeschlossen werden.

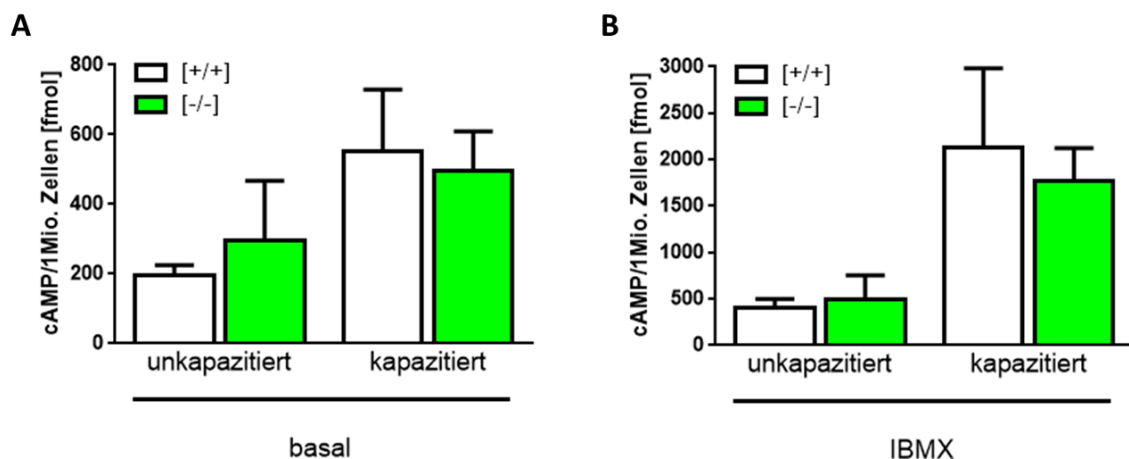


Abbildung 22: Kapazitierungsabhängige quantitative cAMP-Bestimmung in Tas2r131-defizienten Spermien. Von fünf Tas2r131 $[+/-]$ - und $[-/-]$ -Geschwisterpaaren (N6) wurden jeweils unkapazitierte und *in vitro* kapazitierte epididymale Spermien präpariert und mit HS-Puffer oder IBMX (PDE-Inhibitor) stimuliert. Anschließend wurde über eine Chloroform-Trioctylamin Mischung das cAMP extrahiert und die cAMP-Konzentration über einen kompetitiven ELISA in $1 \cdot 10^6$ Zellen gemessen. **[A]** zeigt die basale cAMP-Konzentration in unkapazitierten und kapazitierten Tas2r131 $[+/-]$ - und $[-/-]$ -Spermien, wobei der erwartete Adenylatzyklen-abhängige cAMP-Anstieg in kapazitierten Spermien beider Tas2r131-Genotypen erkennbar war. Unabhängig vom Kapazitierungsgrad der Spermien war kein Tas2r131-abhängiger signifikanter Unterschied in der cAMP-Konzentration zu beobachten. In **[B]** sind Mittelwerte von cAMP-Konzentrationen IBMX-stimulierter Tas2r131-Spermien gezeigt. Die durch IBMX herbeigeführte Inhibierung der cAMP-Hydrolyse führte zur Messung höherer cAMP-Konzentrationen in unkapazitierten und kapazitierten Tas2r131 $[+/-]$ - und $[-/-]$ -Spermien. Im Verlauf der Kapazitierung steigt auch in IBMX-stimulierten Spermien die cAMP-Konzentration an. Zwischen den beiden Genotypen gab es keinen signifikanten. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM; $p \leq 0,05$ *.

Abschließend lässt sich zum einen festhalten, dass eine Abweichung in den Versuchsergebnissen mit Tas2r131-Mäusen unterschiedlichen genetischen Hintergrunds ($<N6$ bzw. N6) festgestellt werden kann: Während in Männchen der ersten Rückkreuzungsgenerationen (N2-N5) eine signifikant erhöhte Spermienanzahl festgestellt wurde (Meyer, 2013), ist dies in der vorliegenden Arbeit an Männchen, die in sechster Generation auf die Wildtyp-Mauslinie C57BL/6N zurückgekreuzt wurden (= N6) nicht mehr zu registrieren (Tabelle 7). Zum anderen konnte,

unabhängig vom genetischen Hintergrund, neben der bereits beschriebenen Genotypverschiebung in Nachkommen von Zuchtpaaren mit Tas2r131 [+/+]-Weibchen und Tas2r131 [+/-]-Männchen, ebenfalls eine derartige Verschiebung unter Nachkommen von Zuchtpaaren mit einem heterozygoten Tas2r131-Weibchen und einem homozygot defizienten Männchen registriert werden. Als Ursache für das beobachtete Phänomen wurde bisher diskutiert, dass heterozygote Männchen möglicherweise anteilig mehr Tas2r131 [-]-Spermien haben als Tas2r131 [+]-Keimzellen. Diese Hypothese konnte allerdings durch die hier vorgestellten Ergebnisse widerlegt werden, die gezeigt haben, dass aus Zuchtpaaren mit Tas2r131 [-/-]-Weibchen und Tas2r131 [+/-]-Männchen keine derartige Verschiebung der Genotypverteilung in den gezeugten Nachkommen hervorgeht. Ergebnisse weiterer Analysen zur Erklärung der Genotypverschiebung, wie z. B. eine mögliche geschlechtsspezifische Vererbung oder eine veränderte Mortalitätsrate der Nachkommen sowie Motilitätsanalysen von Tas2r131-defizienten Spermien lassen die Ursache des beobachteten Phänomens weiterhin offen. Während morphologisch ein vergrößertes Kopfvolumen in Tas2r131-defizienten Spermien festgestellt werden konnte (Abbildung 18), sind alle weiteren strukturellen Befunde, sowie Messungen der intrazellulären Konzentrationen der *second messenger* Ca^{2+} und cAMP zur Überprüfung der internen Signalweiterleitung, weitestgehend unauffällig. Vielversprechend ist jedoch die Beobachtung der höheren Akrosomreaktionsrate in Tas2r131-defizienten Spermien infolge des natürlichen Stimulus der *Zona pellucida* (Abbildung 20). Um dieser möglichen Erklärung für die beobachtete Genotypverschiebung weiter nachzugehen, sind weitere Versuchsansätze nötig.

4.2 Synergistische Auswirkungen der Deletion gustatorischer Signalproteine für die männliche Reproduktion

Die physiologische Bedeutung gustatorischer Signalproteine für die männliche Fertilität wurde in der letzten Dekade durch eine Reihe von Publikationen belegt (Li and Zhou, 2012; Meyer et al., 2012; Mosinger et al., 2013; Xu et al., 2013). In Studien, in denen Gene für gustatorische Signalproteine deletiert wurden, hat sich herausgestellt, dass ein alleiniges Fehlen des Tas1r3, des α -Gustducins (Mosinger et al., 2013), des Umami-Rezeptors Tas1r1 (Meyer et al., 2012), aber auch des Bitterrezeptors Tas2r131 (Abschnitt 4.1) nur geringe Auswirkungen auf den männlichen Reproduktionserfolg hat. Das gleichzeitige Fehlen des Tas1r3 und der gustatorischen G-Protein-Untereinheit α -Gustducin hingegen hat gravierendere Fertilitätseinschränkungen zur Folge (Mosinger et al., 2013). Unter Verwendung einer Tas1r3- α -Gustducin Doppel-*knockout* Maus, die den humanen, pharmakologisch blockierbaren Tas1r3 exprimiert, konnte gezeigt werden, dass die reversible Inhibition des Rezeptors in Abwesenheit des α -Gustducins zur männlichen Sterilität führt. Dies verdeutlicht zum einen, dass in diesem Fall keine ontogenetischen Defekte für die Sterilität der Männchen verantwortlich sind; zum anderen führt es erstmalig zu der Hypothese, dass die Komponenten der Signaltransduktionskaskade, die in den Geschmacksknospen der Zunge für die chemoelektrische Transduktion von süßen Geschmacksstimuli bzw. des Umami-Geschmacks verantwortlich sind, auch im männlichen Reproduktionssystem oder zentralen Regionen, die die Reproduktion kontrollieren, funktionell gekoppelt zu sein scheinen.

Der TRPM5-Ionenkanal, dessen genetische Information auf dem Chromosom 7 der Maus lokalisiert ist (Enklaar et al., 2000), gehört zur Melastatin-Unterfamilie (TRPM1-8) der TRP-Ionenkanäle (Liman, 2014). Diese sind aus sechs Transmembrandomänen aufgebaut und bilden als Tetramer einen Ionenkanal, der permeabel für monovalente Kationen ist und durch Ca^{2+} aktiviert wird (Clapham, 2003; Montell et al., 2002). In den Geschmackspapillen der Zunge vermittelt der TRPM5 sowohl die Transduktion von süßen Geschmacksstoffen, Mononatriumglutamat (MNG), aber auch von allen bisher analysierten bitteren Geschmacksstoffen (Damak et al., 2006; Zhang et al., 2003) und sogar von Fetten (Liu et al., 2011). Auf mRNA-Ebene (Perez et al., 2002) und immunhistochemisch (Li and Zhou, 2012) ist der TRPM5 auch im Hodengewebe nachgewiesen worden. Aufgrund nicht exakt übereinstimmender Befunde bezüglich der genauen Lokalisation des TRPM5 im testikulären Gewebeschnitt, ist jedoch nicht vollständig geklärt, ob eine Expression des Trpm5 ausschließlich in den späten Phasen der Spermatogenese stattfindet (Li and Zhou, 2012), oder ob der Ionenkanal zusätzlich im Interstitialraum in den Leydig Zellen nachgewiesen werden kann (Li, 2013). Da außerdem die Verteilung des TRPM5-Proteins in Spermien noch nicht untersucht wurde, wurde initial mit Hilfe eines TRPM5-spezifischen Antikörpers geprüft, wo exakt der Ionenkanal in Spermien lokalisiert ist.

4.2.1 TRPM5 Expression im männlichen Reproduktionsgewebe

Zur Bestätigung der von Robert Margolskee und seinem Team durchgeführten Northern Blot Analysen (Perez et al., 2002) zum Nachweis des TRPM5-Proteins und damit einer erfolgten Translation im murinen Hodengewebe, wurden RT-PCR Analysen durchgeführt. Hierfür wurden 2 µg muriner testikulärer mRNA aus adulten Männchen des C57BL/6N-Mausstamms für die cDNA-Synthese eingesetzt. Zur Verifizierung der Amplifikationsbedingungen diente mRNA aus Wallpapillen der C57BL/6N-Mäuse. Die gewonnene cDNA wurde zusammen mit spezifischen murinen TRPM5-Primern (Prandi et al., 2013) eingesetzt (siehe 3.1). Die Analyse der größenabhängigen Auftrennung der erhaltenen Amplifikationsprodukte in einem Agarosegel ist in Abbildung 23 exemplarisch dargestellt. Ein Vergleich mit dem DNA-Größenstandard macht deutlich, dass in cDNA der Wallpapille ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von 778 bp amplifiziert wurde (linke Spur, CV). Ein cDNA-Fragment mit gleicher Größe konnte auch aus cDNA des Hodengewebes amplifiziert werden, wobei hier unter gleichen RT-PCR Reaktionsbedingungen eine schwächere Amplifikationsstärke erkennbar ist. In der mitgeführten Negativkontrolle, in die anstelle von cDNA Wasser (H_2O) eingesetzt wurde, ist keine Amplifikation zu erkennen, so dass eine Kontamination der verwendeten Arbeitsmaterialien sowie der PCR-Reagenzien ausgeschlossen werden kann.

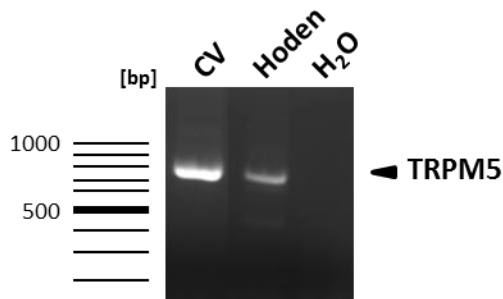


Abbildung 23: Nachweis von TRPM5-Transkripten in murinen Zungen- und Hodengewebe. 2 µg mRNA der Wallpapille (CV) und des Hodens wurde enzymatisch in cDNA umgeschrieben und diese gemeinsam mit TRPM5-spezifischen Primern in RT-PCR-Analysen eingesetzt. Anschließend wurden die Amplifikationsprodukte neben einem DNA-Basenpaarmarker auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels UV-Licht visualisiert. Sowohl mit cDNA der CV (Positivkontrolle), als auch mit Hoden-cDNA konnte eine Bande mit der berechneten Größe (778 bp) amplifiziert werden, wobei die Stärke des detektierten *Trpm5*-Gen Amplifikationsprodukts

im Hoden schwächer war. In der Negativkontrolle [H₂O], die Wasser anstelle von cDNA enthielt, war keine Bande erkennbar, so dass geschlussfolgert werden kann, dass die TRPM5-Transkripte tatsächlich im Hoden vorkommen. Diese Analyse wurde mindestens in drei unabhängigen Versuchen wiederholt.

Um die Lokalisation des TRPM5-Ionenkanals im männlichen Reproduktionsgewebe auf Proteinebene feststellen zu können, wurden immunhistologische Untersuchungen an coronalen Hodenschnitten und immunzytochemische Studien an epididymalen Spermien durchgeführt (siehe 3.3.1.1 und 3.3.1.3). Da mit anti-TRPM5 Antikörpern, die in Zungengewebe ein positives Signal erkennen ließen, trotz des Austestens verschiedener Fixierungsmethoden, unterschiedlicher anti-TRPM5-IgGs und Antikörperverdünnungen des Primär- und Sekundärantikörpers weder in Paraffin- noch in Gefrierschnitten eine Immunreaktion im Hoden detektiert werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt), aber eine Expression des TRPM5-Proteins im Hodengewebe der Maus in der Literatur beschrieben ist (Li, 2013; Li and Zhou, 2012), wurde eine TRPM5-τGFP-Reportermauslinie zur Visualisierung TRPM5-exprimierender Zellen verwendet (Kusumakshi et al., 2015). Unter Zuhilfenahme dieses Mausmodells, in der unter der TRPM5-Promotorkontrolle ein Fusionsprotein des TRPM5-Proteins und des fluoreszierenden Reporterproteins τGFP exprimiert wird, war es möglich, die exakte Lokalisation des Ionenkanals im Gewebe anhand des Fluoreszenzsignals festzustellen.

Abbildung 24 zeigt Gefrierschnitte einer C57BL/6N-Wallpapille und eines Hodens einer TRPM5-τGFP-Maus sowie ausgestrichene und fixierte C57BL/6N-Spermien. Die Präparate der C57BL/6N-Maus wurden mit einem TRPM5-spezifischen Antiserum behandelt, das den C-Terminus des Ionenkanals detektiert (Kaske et al., 2007). Um ein falsch-positives Fluoreszenzsignal einer etwaigen starken Gewebe-Autofluoreszenz im Hoden auszuschließen und das zu detektierende GFP-Signal zu verifizieren, erfolgte für die testikulären Gefrierschnitte der TRPM5-τGFP-Maus eine Inkubation mit einem anti-GFP Antikörper, wobei eine exakt übereinstimmende TRPM5-τGFP- und anti-GFP Markierung erwartet wurde. Die Auswertung der Immunsignale der beiden in Abbildung 24 A dargestellten Geschmacksknospen (gestrichelte Umrandung) einer Wildtyp-Wallpapille (C57BL/6N) macht deutlich, dass der anti-TRPM5 Antikörper, dessen Bindung mit Hilfe einer anschließenden Inkubation mit einem Alexa 546 konjugierten anti-Kaninchen Antikörper aus Esel (rot) sichtbar gemacht wurde, zwei bis sechs spindelförmige Geschmackszellen pro Geschmacksknospe markiert (Perez et al., 2002; Zhao et al., 2003) (Abbildung 24 A).

Für den Nachweis der TRPM5-Expression in Hodengewebe wurden coronale Gefrierschnitte des Hodens einer TRPM5-τGFP Maus angefertigt. In Abbildung 24 B sind deutlich einzelne Hodentubuli (*Tubuli seminiferi*; gestrichelte Linie) zu erkennen, in deren inneren, tubulären Bereich das Reporterprotein τGFP in den späten Stadien der Spermiovorläuferzellen exprimiert

ist. Zwischen den Hodenkanälchen befindet sich der Interstitialraum mit Testosteron-synthetisierenden Leydig Zellen, die ebenfalls grün-fluoreszierend erscheinen (Abbildung 24 B, Pfeilspitze). Zur Verifikation des GFP-Fluoreszenzsignals wurden die TRPM5- τ GFP-Hodenschnitte mit einem anti-GFP Antikörper inkubiert und die Bindung des Erstantikörpers durch eine zweite Inkubation mit einem Alexa 546 konjugierten anti-Kaninchen Antikörper nachgewiesen. Die Überlagerung des grünen und roten Fluoreszenzkanals zeigt durch die erkennbaren gelben Areale völlig deckungsgleiche Antikörper-, sowie Reporterproteinmarkierungen, so dass davon auszugehen ist, dass es sich bei der wahrgenommenen grünen Fluoreszenz nicht um grün erscheinende Autofluoreszenz des Gewebes handelt, sondern um endogen exprimierte τ GFP-Fluoreszenz. Mit Hilfe dieser Befunde, die eine Lokalisation des TRPM5 sowohl in den späten Spermatogenesestadien der *Tubuli seminiferi* als auch in den Leydig Zellen zeigen, können die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Feng Li (Li, 2013) bestätigt werden. In dem Vergleich, während welcher Stadien der Spermatogenese eine TRPM5-Expression auftritt, ist zu erkennen, dass der TRPM5-Ionenkanal, ähnlich dem Umami-Rezeptor (Tas1r1) und dem Tas1r3 (Meyer et al., 2012) aber auch dem Bitterrezeptor Tas2r131 (Abbildung 16), in den späten Stadien der Spermatogenese exprimiert wird (Abbildung 24 B).

Da eine Expression des TRPM5 in maturen Spermien bisher noch nicht gezeigt wurde, wurden Spermien aus dem caudalen Bereich des Nebenhodens von C57BL/6N-Männchen auf Objektträgern ausgestrichen, mit Methanol fixiert und dann mit dem anti-TRPM5 Antikörper, dessen Bindung mit einem Alexa 546 konjugierten anti-Kaninchen Sekundärantikörper aus Esel (rot) nachgewiesen wurde, inkubiert. Zur Unterscheidung des Zellkerns und des Akrosoms im Spermienkopf wurde die Kern-DNA mit dem DNA-bindenden Farbstoff TO-PRO-3 angefärbt (blau). Zur Markierung des Akrosoms wurde das Lektin *Peanut agglutinin* (PNA) (Aviles et al., 1997) eingesetzt, das direkt über eine FITC-Konjugation visualisiert werden konnte (grün) (siehe 3.3.1.3.3). Sowohl in Spermienköpfen als auch im Flagellum der Keimzellen ist eine immunologische Markierung durch den anti-TRPM5 Antikörper erkennbar (Abbildung 24 C). Die Markierung des TRPM5 im Flagellum ist im Hauptstück detektierbar (Abbildung 24, Pfeil), während die immunologische TRPM5-Markierung am konvexen Rand des Spermienkopfes mit dem grünen Fluoreszenz-gekoppelten akrosomalen Marker (PNA-FITC) überlappend erscheint und daher dem Akrosom zugeordnet werden kann. Die gelbe, fast deckungsgleiche Färbung in der überlagerten Darstellung macht deutlich, dass das Antikörpersignal und das akrosomale PNA-Signal colokalisiert erscheinen (Abbildung 24, Stern).

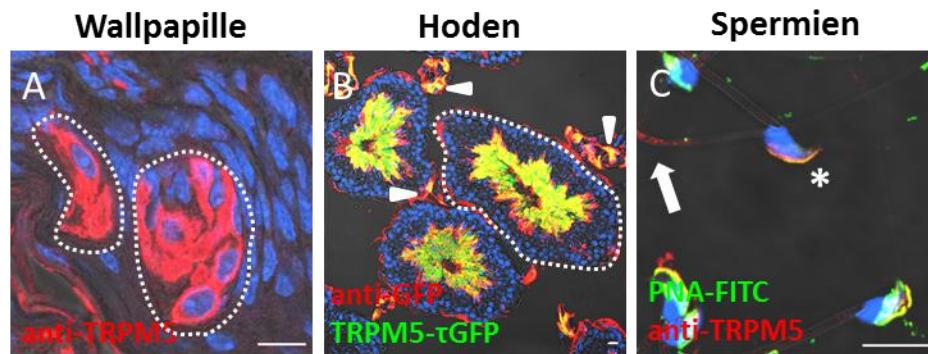


Abbildung 24: TRPM5-Expression im männlichen Reproduktionsgewebe der Maus. In Gefrierschnitten einer C57BL/6N-Wallpapille wurden mit einem anti-TRPM5 Antiserum aus dem Kaninchen und einem rot-fluoreszierenden Alexa 546 konjugierten anti-Kaninchen Sekundärantikörper aus Esel einzelne spindelförmige Geschmackszellen in Geschmacksknospen gekennzeichnet [A]. Zur Visualisierung des TRPM5 im Hoden wurden Gefrierschnitte vom Hoden einer Reportermauslinie (TRPM5-tGFP) eingesetzt. In den Mäusen wird ein TRPM5-tGFP-Fusionsprotein exprimiert, wodurch eine Identifizierung TRPM5-exprimierender Zellen möglich ist. Um die Spezifität der erkennbaren GFP-Fluoreszenz zu verifizieren, wurde das exprimierte tGFP mit einem anti-GFP Antikörper und einem rot-fluoreszierenden Alexa 546 konjugierten anti-Kaninchen Sekundärantikörper aus Esel nachgewiesen. Die Colokalisation des Fusionsproteinsignals (grün) und des anti-GFP Signals (rot) erscheint in der Überlagerung gelb, wodurch die Expression beider Proteine (TRPM5 und GFP) in exakt den gleichen Zellen gezeigt werden kann [B]. Es ist erkennbar, dass die TRPM5-Expression fast ausschließlich auf die luminal gelegenen Spermatozyten und reifen Spermatiden innerhalb der *Tubuli seminiferi* beschränkt ist. Auch für die zwischen den einzelnen Samenkanälchen gelegenen Leydig Zellen kann eine Expression des TRPM5-Ionenkanals festgestellt werden [B, Pfeilspitzen]. Nach einer immunologischen Behandlung mit dem bereits in [A] verwendeten anti-TRPM5 Antiserum und dem rot-fluoreszierenden Sekundärantikörper (s.o.) kann an ausgestrichenen epididymalen Spermien von C57BL/6N-Männchen eine Markierung des Flagellums [C, Pfeil] und des Akrosoms registriert werden [C, Stern]. Das Akrosom ist mit einem spezifischen Marker (PNA-FITC) markiert (grün) und zeigt durch die exakte Colokalisation mit dem roten anti-TRPM5-Signal in der Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle eine gelbe Sichelmmarkierung. Die durch TO-PRO-3 markierten Zellkerne sind blau dargestellt. Maßstab: 10 μ m.

4.2.2 *In vivo* Fertilitäts-Analysen von TRPM5-defizienten Tieren

Nachdem auf mRNA- und Proteinebene die Expression des TRPM5 sowohl in Hodengewebe als auch in Spermien gezeigt werden konnte, wurde anschließend untersucht, ob TRPM5-*knockout*-Mäuse einen Reproduktionsphänotyp zeigen. Zur genaueren Untersuchung des TRPM5-*Knockouts* wurden Mäuse der *Trpm5*^{tm1Dgen/J}-Mauslinie (Jackson Laboratory, USA) (Larsson et al., 2015) verwendet und initial die TRPM5-Deletion mit einem TRPM5-Antiserum (Kaske et al., 2007) in Gefrierschnitten der Wallpapille überprüft (siehe 3.3.1.1). Als Positivkontrolle für diesen Versuchsansatz dienten coronale Gewebeschnitte einer *circumvallaten* Papille (Wallpapille, CV) einer C57BL/6N-Maus (TRPM5 [+/+]). In Abbildung 25 sind exemplarische Aufnahmen der Fluoreszenzmarkierungen gezeigt: In Gewebeschnitten der TRPM5 [+/-]-Maus konnte erwartungsgemäß eine positive Immunreaktion in einzelnen, spindelförmigen Geschmackszellen detektiert werden, deren Markierung im Wesentlichen auf die Plasmamembran beschränkt war (Abbildung 25 A und B). Ein Vergleich der TRPM5-Antikörpermarkierung in Wallpapillen der TRPM5 [-/-]-Maus zeigt hingegen keine positive Markierung der einzelnen Geschmackszellen (Abbildung 25 C und D).

Zur Untersuchung der anti-TRPM5 Immunreaktivität in epididymalen Spermien wurden parallel zu den histologischen Immunreaktionen an Zungengewebe immunzytochemische Markierungen an Spermien von TRPM5 [+/-]- und [-/-]-Männchen durchgeführt (siehe 3.3.1.3). Wie in Abbildung 24 C bereits gezeigt, kann in TRPM5 [+/-]-Spermien eine Markierung des Flagellum-

Hauptstücks (Abbildung 25 E und F, Pfeil) und des Akrosoms (Abbildung 25 E und F, Stern) detektiert werden. Eine derartige immunologische Reaktion bleibt in TRPM5 $[-/-]$ -Spermien gänzlich aus (Abbildung 25 G und H), wodurch einerseits die TRPM5-Deletion verifiziert und andererseits die Spezifität des anti-TRPM5 Antikörpers gezeigt werden konnte.

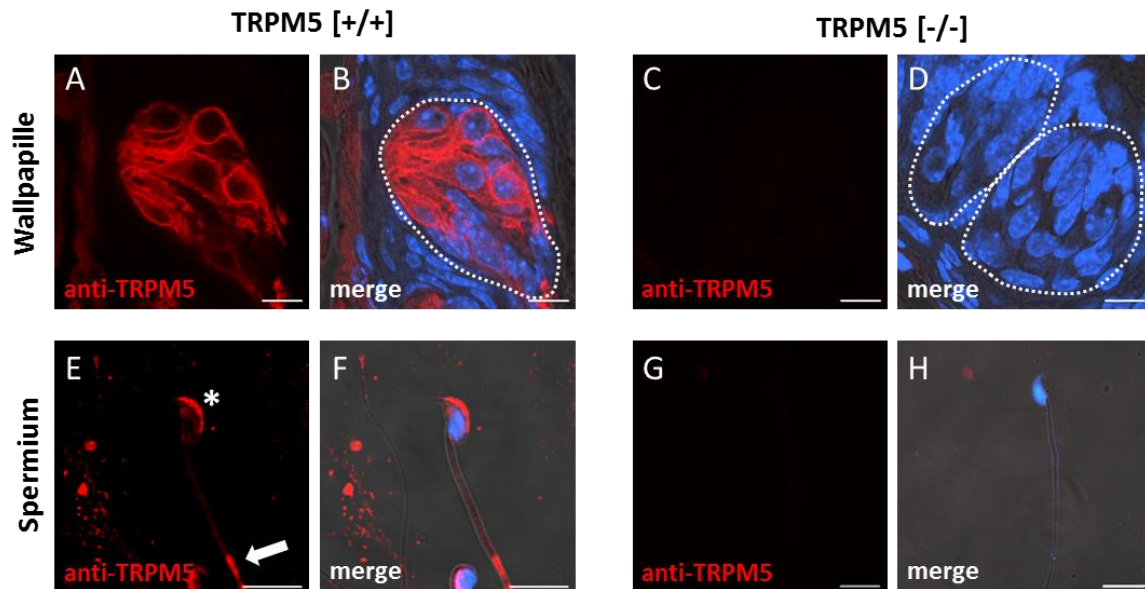


Abbildung 25: Immunologische Verifizierung des TRPM5-Knockouts. An coronalen Gefrierschnitten der Wallpapille von TRPM5 $[+/+]$ -Mäusen (C57BL/6N) und TRPM5 $[-/-]$ -Tieren sowie an isolierten epididymalen Spermien beider Mauslinien wurden Antikörper-Nachweisreaktionen mit einem anti-TRPM5 Antiserum und einem rot-fluoreszierenden Alexa 546 konjugierten anti-Kaninchen Sekundärantikörper aus Esel durchgeführt.

[A] zeigt eine vergrößerte Aufnahme von TRPM5-exprimierenden Geschmackszellen (rot) in einer Geschmacksknospe einer TRPM5 $[+/+]$ -Maus. In TRPM5 $[+/+]$ -Spermien kann ebenfalls eine immunologische Reaktion des anti-TRPM5 Antiserums im Flagellum [E, Pfeil] und Akrosom [E, Stern] detektiert werden. Aufnahmen einer TRPM5 $[-/-]$ -Geschmacksknospe [C] und TRPM5 $[-/-]$ -Spermien [G] zeigen keine positive Immunreaktion auf die anti-TRPM5-Inkubation, wodurch eine erfolgreiche Deletion des Ionenkanals in den verwendeten TRPM5 $[-/-]$ -Mäusen belegt werden kann. In [B], [D], [F] und [H] sind Überlagerungen des roten Fluoreszenzkanals (TRPM5) sowie einer strukturverdeutlichenden Durchlichtaufnahme und TO-PRO-3 angefärbter Zellkernstrukturen (blau dargestellt) abgebildet. Mit gestrichelten Linien sind einzelne Geschmacksknospen mit darin enthaltenen Geschmackszellen hervorgehoben. Maßstab: 10 μ m.

Nachdem die bisherigen Befunde zeigen, dass der TRPM5-Ionenkanal im männlichen Reproduktionstrakt (in Leydig Zellen, Spermatozyten sowie reifen Spermatiden (Abbildung 24 B) und Spermien (Abbildung 24 C und Abbildung 25 E)) exprimiert wird, war es wichtig zu prüfen, ob eine Deletion des gustatorischen Ionenkanals TRPM5 den Reproduktionserfolg beeinflusst. Hierfür wurden homozygot defiziente TRPM5 $[-/-]$ -Weibchen und -Männchen verpaart und der Reproduktionserfolg in einer kontinuierlichen, monogamen Zucht erfasst. In Abbildung 26 sind die Reproduktionsparameter „Wurfabstand“ und „Wurfgröße“ der TRPM5 $[-/-]$ -Verpaarungen im Vergleich zu TRPM5 $[+/+]$ - (C57BL/6N) Zuchtpaaren tabellarisch zusammengefasst und die Überlebensrate TRPM5-defizienter Nachkommen grafisch dargestellt. Ein Vergleich der erfassten Daten zeigt, dass eine TRPM5-Defizienz keine gravierende Auswirkung auf die Fertilität *in vivo* zu haben scheint. In monogamen Verpaarungen war weder ein auffallend veränderter zeitlicher Abstand zwischen den Würfen (TRPM5 $[+/+]$: $33,2 \pm 2,0$ Tage; TRPM5 $[-/-]$: $34,7 \pm 2,3$ Tage; unpaariger T-Test: $p = 0,621$), noch eine Abweichung hinsichtlich der Wurfgröße (TRPM5 $[+/+]$:

6,0 ± 0,2; TRPM5 [-/-]: 5,2 ± 0,3; unpaariger T-Test: $p = 0,325$) oder eine veränderte Geschlechterverteilung unter den Nachkommen (TRPM5 [+/+]: 56 ± 0,3 % ♂; TRPM5 [-/-]: 52 ± 0,4 % ♂; Chi-Test: $p = 0,470$) feststellbar. Durch die Berechnungen der Anteile verstorbener Nachkommen pro Wurf und der daraus ermittelten prozentualen Überlebensrate wird allerdings deutlich, dass TRPM5-defiziente Nachkommen eine klare, aber nicht signifikant geringere Überlebensrate (76,8 ± 7,2 %; unpaariger T-Test: $p = 0,104$) haben als C57BL/6N-Nachkommen (90,0 ± 3,2 %).

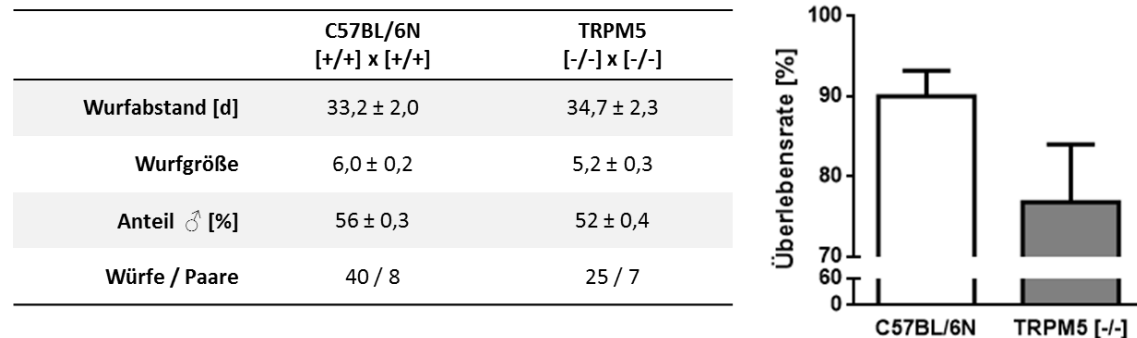


Abbildung 26: Analyse der Fertilität von TRPM5-defizienten Mäusen. In monogamen und kontinuierlichen Verpaarungen homozygot defizienter TRPM5-Mäuse wurden die Reproduktionsparameter Wurfabstand, Wurfgröße und der prozentuale Anteil der Männchen an den Gesamtnachkommen erfasst sowie die Überlebensrate TRPM5-defizienter Nachkommen bestimmt und mit den Daten von TRPM5 [+/+] (C57BL/6N)-Zuchtpaaren verglichen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der untersuchten Fertilitätsparameter festgestellt. Jedoch fiel eine reduzierte Überlebensrate der TRPM5 [-/-]-Nachkommen auf. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM; $p \leq 0,05$ *.

4.2.3 Funktionalitätsanalysen TRPM5-defizienter Spermien

Im gustatorischen System fungiert der TRPM5 als Ionenkanal durch den, resultierend aus der Bindung eines Liganden an einen Geschmacksrezeptor, Ca^{2+} -abhängig monovalente Kationen in die Zelle einströmen und diese depolarisieren (Damak et al., 2006; Liu and Liman, 2003; Zhang et al., 2003). Dadurch kommt es zur Ausschüttung von ATP und damit zur parakrinen Signalweiterleitung an das afferente Neuron zum Gehirn (Finger et al., 2005; Huang et al., 2011; Huang et al., 2007). Wie in vielen unterschiedlichen Systemen spielt Ca^{2+} auch für die sekundäre Reifung und die Akrosomreaktion in Spermien eine wichtige Rolle (Baldi et al., 1991; Breitbart, 2002b; Navarrete et al., 2015; Yanagimachi and Usui, 1974). Daher war es wichtig herauszufinden, ob sich die TRPM5-Deletion auf die intrazelluläre, basale Ca^{2+} -Konzentration der Spermien auswirkt und ob der für die Befruchtung essentielle Vorgang der Akrosomreaktion beeinträchtigt ist.

Zur Untersuchung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurden Ca^{2+} -Konzentrationsmessungen in Spermienköpfen durchgeführt. Hierbei wurden isolierte, epididymale Spermien von TRPM5-defizienten Männchen unkapazitiert, oder *in vitro* kapazitiert mit Fura-2AM beladen und die ratiometrischen Messwerte des Ca^{2+} -sensitiven Fura-2 erfasst und über den ungepaarten T-Test mit Messergebnissen von C57BL/6N-Spermien statistisch verglichen. Anhand von Messungen an Spermien von jeweils fünf Männchen zeigte sich, dass die basale intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in unkapazitierten TRPM5 [-]-Spermien ($0,318 \pm 0,01$; $p = 0,461$) und in *in vitro* kapazitierten TRPM5 [-]-Spermien sogar signifikant höher ist ($0,372 \pm 0,01$; $p = 0,002$), als in

vergleichenden Messungen an C57BL/6N-Spermien (unkapazitiert: $0,306 \pm 0,01$; kapazitiert: $0,325 \pm 0,01$). In beiden Spermienpopulationen der C57BL/6N- und TRPM5 [-/-]-Männchen kann der Kapazitierungs-bedingte Ca^{2+} -Anstieg festgestellt werden. Während der Konzentrationsunterschied des *second messengers* in unkapazitierten Spermien nicht stark ausgeprägt ist, ist die erhöhte basale Ca^{2+} -Konzentration in kapazitierten C57BL/6N- und TRPM5-defizienten Spermien signifikant voneinander abweichend ($p = 0,002$) (Abbildung 27 A).

Eine derart veränderte Ca^{2+} -Konzentration kann eine veränderte Akrosomreaktion hervorrufen (Breitbart, 2002b; Rossato et al., 2001) und so die Befruchtungskompetenz der TRPM5-defizienten Männchen beeinflussen. Um primär eine mögliche Beeinträchtigung der akrosomalen Exozytosemaschinerie durch die TRPM5-Deletion festzustellen, wurden *in vitro* kapazitierte, epididymale Spermien von 15 C57BL/6N- und neun TRPM5 [-/-]-Männchen nach 90 min mit dem Ca^{2+} -Ionophor A23187 (10 μM) bzw. in parallelen Kontrollansätzen mit dem Lösungsmittel (0,1 % DMSO) 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch eine Fixierung abrupt gestoppt, die Spermien auf einem Objektträger ausgestrichen, mit Coomassie gefärbt und die Akrosomreaktionsraten mikroskopisch quantifiziert. Zur Bestimmung der maximal induzierbaren Akrosomreaktion mit A23187 in Spermien wurden die ausgezählten Akrosomreaktionsraten der A23187- und DMSO-Stimulationsansätze voneinander subtrahiert und folgend als A23187-Induktion bezeichnet. In Abbildung 27 B sind die A23187-Induktionsraten von C57BL/6N- und TRPM5 [-/-]-Spermien vergleichend dargestellt. Durch eine statistische Analyse mit einem unpaarigen T-Test konnte keine signifikante Abweichung in der akrosomalen Exozytose der Spermien festgestellt werden, jedoch war eine leicht erhöhte Rate in TRPM5-defizienten Spermien zu erkennen (TRPM5 [-/-]: $26,1 \pm 5,2$ % $p = 0,663$; C57BL/6N: $23,7 \pm 1,7$ %). Um neben der Funktionalität der akrosomalen Exozytosemaschinerie auch die Höhe der Stimulus-unabhängigen, spontanen Akrosomreaktion zu bestimmen (Klemm and Engel, 1991; Mortimer et al., 1989; Visconti et al., 1999) und zu prüfen, ob die in Abbildung 27 A dargestellte leicht erhöhte basale Ca^{2+} -Konzentration in TRPM5 [-/-]-Spermien einen Einfluss auf die spontane Akrosomreaktionsrate hat, wurde die akrosomale Exozytose in Abhängigkeit von der Zeit quantitativ bestimmt. Abbildung 27 C zeigt den Zeit-abhängigen Anstieg der spontanen Akrosomreaktionsrate in Spermien, der für die Kapazitierung typisch ist (Inoue et al., 2003; Klemm and Engel, 1991; Mortimer et al., 1989; Oehninger et al., 1994; Visconti et al., 1999). Es ist zu erkennen, dass TRPM5 [-/-]-Spermien zu jedem Messzeitpunkt eine höhere spontane Akrosomreaktionsrate zeigen als C57BL/6N-Spermien. Jedoch ist dieser Unterschied zu keinem Zeitpunkt signifikant abweichend.

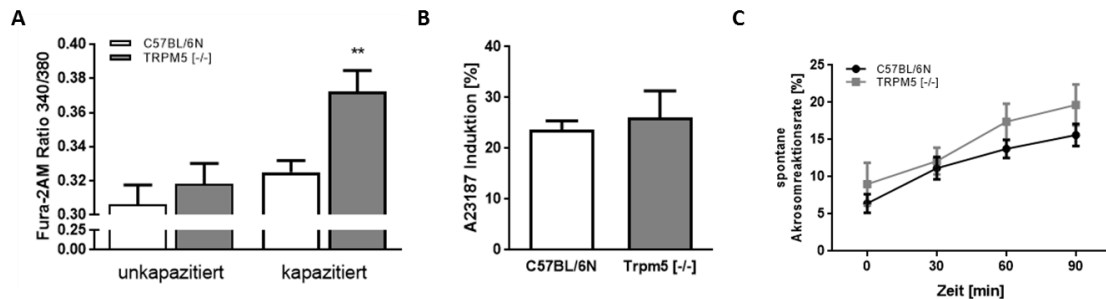


Abbildung 27: Quantifizierung der basalen Ca^{2+} -Konzentration und der spontanen Akrosomreaktionsrate in TRPM5-defizienten Spermien. Um den Einfluss der TRPM5-Deletion auf die intrazelluläre Funktionalität der isolierten, epididymalen Spermien zu testen, wurde über Fura-2AM basierende Messungen das basale Ca^{2+} -Level in den Spermien bestimmt und parallel die Höhe des Stimulus-unabhängigen Akrosomverlusts erfasst, die Aufschluss über die Fähigkeit eine Akrosomreaktion durchzuführen, gibt. **[A]** stellt die Ergebnisse der ratiometrischen Ca^{2+} -Konzentrationsbestimmung von unkapazitierten und *in vitro* kapazitierten Spermien von jeweils fünf C57BL/6N- und TRPM5 [-/-]-Männchen grafisch dar und zeigt den Kapazierungs-abhängigen Ca^{2+} -Anstieg in beiden Populationen kapazitierten Spermien. Sowohl in unkapazitierten als auch in kapazitierten Spermien ist ein erhöhtes basales Ca^{2+} -Level in TRPM5-defizienten Spermien messbar, welches in kapazitierten Spermien sogar gegenüber C57BL/6N-Spermien signifikant erhöht ist. Anzahl der Einzelzellmessungen: C57BL/6N unkapazitiert (35), kapazitiert (56); TRPM5 [-/-] unkapazitiert (52), kapazitiert (33).

In **[B]** ist die Höhe der A23187-Induktion in Spermien von C57BL/6N- und TRPM5 [-/-]-Männchen gezeigt, die durch die Subtraktion der erfassten Akrosomreaktionsraten von A23187-stimulierten und mit dem Lösungsmittel (0,1 % DMSO) stimulierten Spermien berechnet wurde. Durch das Ca^{2+} -Ionophor A23187 wird die maximal mögliche Akrosomreaktion in Spermien ausgelöst und damit gleichzeitig die Funktionalität des intrazellulären Signalablaufs überprüft. In C57BL/6N- und TRPM5 [-/-]-Spermien ist eine A23187-Induktion erkennbar, die in TRPM5 [-/-]-Spermien nicht signifikant höher ist. Der Zeit-abhängige Verlauf der spontanen Akrosomreaktion in *in vitro* kapazitierenden Spermien ist in **[C]** gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass für Spermien von TRPM5-defizienten Männchen stets eine höhere, Stimulus-unabhängige spontane Akrosomreaktionsrate festgestellt werden kann, die jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich zu den bestimmten Raten der C57BL/6N-Spermien ist. Anzahl der untersuchten Tiere in **[B]** und **[C]**: C57BL/6N (15); TRPM5 [-/-] (9). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM; $p \leq 0,05$ *.

4.2.4 Zucht-basierte Generierung von Mauslinien mit einer gleichzeitigen Deletion des TRPM5 und des Umami-Rezeptors Tas1r1, oder des Bitterrezeptors Tas2r131

Während die gemeinsame Deletion des Tas1r3 und α -Gustducins zu einem schwerwiegenden Reproduktionsphänotyp führt (Mosinger et al., 2013) und die Einzel-Knockouts der Geschmacksrezeptoren Tas1r1 (Meyer et al., 2012) und Tas2r131 (Abschnitt 4.1) sowie der gustatorischen Signalproteine α -Gustducin (Mosinger et al., 2013) und TRPM5 (Abbildung 26) einen nur schwach ausgeprägten Effekt zeigen, wurde mit Hilfe von Doppel-knockout-Mausmodellen geprüft, ob eine Deletion des Tas1r1 bzw. Tas2r131 zusammen mit dem TRPM5 zu stärkeren Auswirkungen für das männliche Reproduktionspotential führt. Um die entsprechenden homozygoten Doppel-knockout-Mäuse zu erhalten, die im Folgenden zur Vereinfachung als „TasR-TRPM5 DKO“ bezeichnet werden, wurden Tas1r1^{BL-IRES-mcherry} [-/-]-Mäuse (Rezeptor-codierende Sequenz durch mcherry-Fluoreszenzkassette ersetzt und unter Tas1r1-Promotorkontrolle exprimiert) (Meyer et al., 2012; Voigt et al., 2012) bzw. Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP} [-/-]- Mäuse (gleiches Prinzip, wie bei Tas1r1^{BL-IRES-mcherry}-Maus) (Voigt et al., 2012) mit Mäusen einer TRPM5 [-/-]-Mauslinie (Larsson et al., 2015) gekreuzt.

Die Generierung von Mäusen, die für die genetischen Merkmale Tas1r1 oder Tas2r131 und TRPM5 homozygot defizient sind, erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden Zuchtansätzen. In einem ersten Schritt wurde eine TasR [-/-]-, TRPM5 [+/+]-Maus (homozygot defizient für den Geschmacksrezeptor; Wildtyp für TRPM5) mit einer TasR [+/+]-, TRPM5 [-/-]-Maus (Wildtyp für

Geschmacksrezeptor; homozygot defizient für TRPM5) verpaart. Aus diesen Zuchtansätzen konnten nur Nachkommen entstehen, die eine heterozygote $+/ -$ genetische Information für beide Merkmale (TasR und TRPM5) exprimierten. In einem zweiten Schritt wurden die heterozygoten TasR-TRPM5 $+/ -$ -Nachkommen miteinander verpaart, so dass nach der Mendelschen Vererbungslehre (Campbell et al., 2003) Nachkommen mit neun verschiedenen Genotyp-Kombinationen und einer bestimmten erwarteten prozentualen Wahrscheinlichkeit entstehen konnten (Abbildung 28). Die Wahrscheinlichkeit, dass aus den beschriebenen Verpaarungen Nachkommen mit einem doppelten homozygot defizienten Genotyp für beide Merkmale (TasR und TRPM5) entstehen, lag dabei bei 6,25 %.

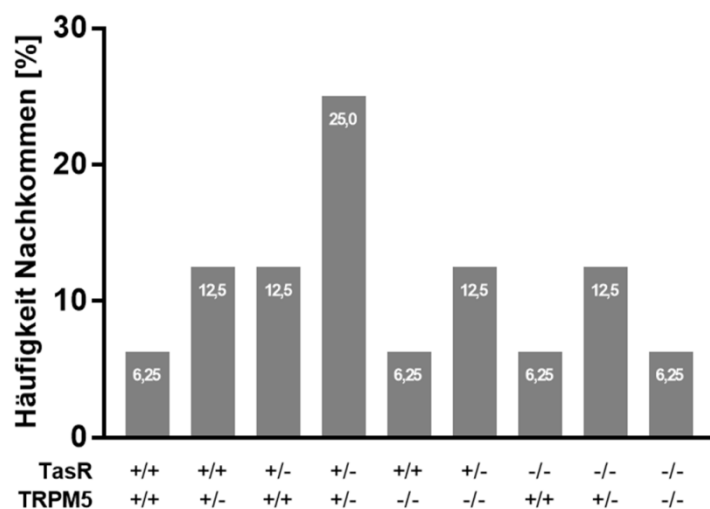


Abbildung 28: Wahrscheinlichkeit der Genotyp-Kombinationen in Erbgängen mit zwei Merkmalen. Aus Zuchtansätzen zweier Individuen mit heterozygoten Erbanlagen für zwei verschiedene Merkmale können Nachkommen mit neun unterschiedlichen Genotyp-Kombinationen entstehen. Abgebildet sind die möglichen Kombinationen der Genotypen für die Merkmale *TasR* und *Trpm5* und die prozentuale Wahrscheinlichkeit, mit der das Ereignis eintritt.

Die Bestimmung des Genotyps einer möglichen TasR-TRPM5-DKO Maus erfolgte mit Hilfe von PCR-basierenden Genotypisierungen, wobei spezifische Primer für den *Tas1r1* bzw. *mcherry*, den *Tas2r131* bzw. *hrGFP* und den TRPM5 verwendet wurden (siehe 3.2.2). Im Detail wurde dazu aus Schwanzspitzenbiopsien genomische DNA isoliert und in PCR-Reaktionen eingesetzt. Die amplifizierten DNA-Abschnitte wurden anschließend gemeinsam mit einem DNA-Größenstandard auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe einer UV-Belichtung und des mitgeführten Größenstandards wurde die Größe des Amplifikationsprodukts erfasst und anhand derer der Genotyp für das analysierte Merkmal des untersuchten Tiers bestimmt.

In Abbildung 29 ist eine beispielhafte Aufnahme eines Genotypisierungs-Ergebnisses einer Wildtyp $+/ +$ - und homozygot defizienten $-/-$ *Tas1r1*- bzw. *Tas2r131* Maus sowie einer TasR-TRPM5-DKO Maus gezeigt. In den ersten beiden Spuren des dargestellten Agarosegels sind Amplifikationsbanden für den *Tas1r1* (711 bp) und den TRPM5 (346 bp) erkennbar, so dass für diese Maus der Wildtyp-Genotyp sowohl für den *Tas1r1* als auch für den TRPM5 abgeleitet werden konnte. In den beiden darauffolgenden Spuren sind die Banden auf Höhe des zu erwartenden Produkts des *mcherry*-Fluoreszenzproteins (= *Tas1r1* $-/-$) (462 bp) und des TRPM5 (346 bp) zu detektieren. Das hierbei analysierte Tier hat hinsichtlich des *Tas1r1* einen homozygot defizienten Genotyp, während es gleichzeitig die Wildtypform des *Trpm5*-Gens exprimiert. Die fünfte und sechste Gelspur zeigt eine *Tas1r1* $-/-$ -Bande (462 bp) und eine TRPM5 $-/-$ -Bande

(575 bp), wodurch feststeht, dass die untersuchte DNA von einer Tas1r1-TRPM5 doppelt homozygot defizienten Maus stammt. Für die beispielhaft dargestellte Genotypisierung von Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Mäusen wurde die gleiche Reihenfolge des Probenauftrags gewählt, so dass in den Spuren sieben und acht ein Tas2r131-TRPM5 [+/+]- und in den Spuren neun und zehn ein Tas2r131 [-/-]- TRPM5 [+/+]-Genotyp erkannt werden kann. In den Spuren elf und zwölf wurden Amplifikationsprodukte einer Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Maus aufgetragen (Amplifikationsprodukte: Tas2r131 [+/+] 455 bp; hrGFP (=Tas2r131 [-/-]) 368 bp; TRPM5 [+/+] 346 bp; TRPM5 [-/-] 575 bp) (Abbildung 29).

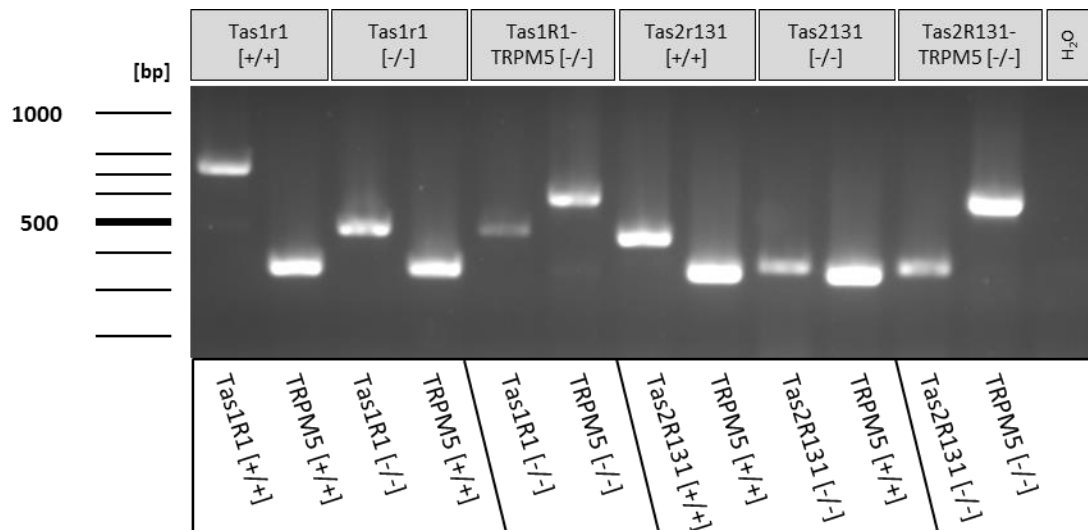


Abbildung 29: Molekularbiologische Erfassung von TasR-TRPM5-defizienten Mäusen. Die Bestimmung des Genotyps einer Maus erfolgte anhand einer Schwanzspitzenbiopsie und der daraus isolierten DNA. Unter Verwendung spezifischer Tas1r1-, Tas2r131- und TRPM5-Primer in einer PCR konnten Wildtyp [+/+]- und *Knockout* [-/-]- Allelkombinationen mit Hilfe einer elektrophoretischen Auftrennung der Amplifikationsprodukte identifiziert werden. Die ersten beiden Spuren der abgebildeten Aufnahme zeigen den Genotyp einer Tas1r1 Wildtyp ([+/+])- Maus hinsichtlich der Merkmale Tas1r1 und TRPM5. In den Spuren 3 und 4 ist das Amplifikationsprodukt der DNA einer Tas1r1 [-/-]- Maus aufgetragen. Durch die Größe der DNA-Banden ist die homozygot defiziente Erbanlage des Tas1r1 und die genetische Wildtyp-Information für den TRPM5 zu erfassen. Der doppelt homozygot defiziente Genotyp einer Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Maus wird durch eine 462 bp Bande (Tas1r1 [-/-]) und eine 575 bp Bande (Trpm5 [-/-]) in den Gelspuren 5 und 6 widergespiegelt. In den Spuren 7-12 sind nach dem gleichen Auftragsschema PCR-Proben einer Tas2r131 [+/+]-, Tas2r131 [-/-]- und Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Maus aufgetragen. In der Negativkontrolle [H₂O], die Wasser anstelle von cDNA enthielt, trat keine Bande auf, so dass eine Kontamination der PCR-Reagenzien ausgeschlossen werden konnte. Amplifikationsprodukte: Tas1r1 [+/+] 711 bp, Tas1r1 [-/-] 462 bp; Tas2r131 [+/+] 455 bp; Tas2r131 [-/-] 368 bp; TRPM5 [+/+] 346 bp; TRPM5 [-/-] 575 bp.

Neben der molekularbiologischen Identifikation des TasR-TRPM5 [-/-]-Genotyps war es unter Verwendung eines anti-TRPM5 Antiserums auch auf immunhistochemischen Weg möglich, einen doppelten homozygot defizienten TasR-TRPM5 Genotyp zu bestätigen. Hierbei konnte die Tas1r1- bzw. Tas2r131 Deletion durch die Expression der Reporterproteine mcherry (Tas1r1) bzw. hrGFP (Tas2r131) festgestellt werden, während der Nachweis der TRPM5-Deletion über eine ausbleibende immunologische Reaktion mit einem anti-TRPM5 Antiserum aus dem Kaninchen und einem fluoreszierenden Sekundärantikörper erfolgte (siehe 3.3.1.1). Für Gewebeschnitte einer Maus mit genetischen Wildtyp-Anlagen bezüglich der Tas1r1 und Tas2r131-Rezeptoren wurde keine Geschmacksrezeptor-Fluoreszenzmarkierung erwartet,

wohingegen der anti-TRPM5 Antikörper eine Immunreaktion auslösen sollte. Umgekehrt wurde für Gewebeschnitte einer TasR-TRPM5 Doppel-*knockout* Maus die Expression der mcherry- und hrGFP-Reporterproteine, jedoch keine immunologische Markierung durch den anti-TRPM5 Antikörper erwartet. Für den immunhistologischen Nachweis einer TasR-TRPM5 Deletion wurden coronale Schnitte einer Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Pilzpapille und Gewebeschnitte einer Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Wallpapille mit einem anti-TRPM5 Antiserum inkubiert. Als Positivkontrollen dienten in diesem Versuchsansatz anti-TRPM5 markierte Gewebeschnitte der Wallpapille von TRPM5 [+/+]- (C57BL/6N)- und Tas2r131 [-/-]-Mäusen bzw. anti-TRPM5 markierte Gewebeschnitte der Pilzpapillen von Tas1r1 [-/-]-Mäusen. In den Aufnahmen der Abbildung 30 sind in den dargestellten Geschmackszellen unter anderem die Signale der Reporterfluoreszenzproteine einer Tas1r1 [-/-]- (Abbildung 30 D [Stern], rot), Tas2r131 [-/-]- (Abbildung 30 G [Stern], grün), Tas1r1-TRPM5 [-/-]- (Abbildung 30 J [Stern], rot) und einer Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Maus (Abbildung 30 M [Stern], grün) zu erkennen. Durch die Detektion der geschmacksrezeptorspezifischen Fluoreszenzsignale in allen vier untersuchten Mauslinien ist die homozygot defiziente genetische Information der Geschmackszellen sichtbar. Aufgrund des roten Tas1r1-Fluoreszenzreporterproteins *mcherry* wurde die TRPM5-Markierung in Tas1r1 [-/-]- und Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Gewebe mit einem grün-fluoreszierenden Alexa 488 konjugierten anti-Kaninchen Sekundärantikörper aus der Ziege nachgewiesen. In TRPM5 [+/+]- und Tas2r131 [-/-]- bzw. Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Zungengewebe wurde hingegen der rot-fluoreszierende Alexa 546 konjugierte anti-Kaninchen Sekundärantikörper aus dem Esel verwendet. In Abbildung 30 sind TRPM5-positive Geschmackszellen in TRPM5 [+/+]- (Abbildung 30 B; rot, Pfeil), Tas1r1 [-/-]- (Abbildung 30 E; grün, Pfeil) und Tas2r131 [-/-]- (Abbildung 30 H; rot, Pfeil) Geschmackspapillen gezeigt. Ein derartiger Nachweis kann weder in Tas1r1-TRPM5 [-/-]- (Abbildung 30 K), noch in Tas2r131-TRPM5 [-/-]- (Abbildung 30 O) Geschmackspapillen erbracht werden. In der Überlagerung des roten- und grünen Fluoreszenzkanals, gemeinsam mit einer Durchlichtaufnahme und der TO-PRO-3-basierten Zellkernmarkierung (blau) sind einzelne Geschmacksknospen (gestrichelte Linie) und die Fluoreszenzsignale der Geschmackszellen Tas1r1 und Tas2r131 sowie des Ionenkanals TRPM5 gezeigt (Abbildung 30 C, F, I, L, P). In der überlagerten Darstellung wird deutlich, dass die beobachteten Tas1r1 [-/-]- und Tas2r131 [-/-]- Signale mit einzelnen anti-TRPM5 Signalen colokalisiert erscheinen (Abbildung 30 F und I [Raute]), wobei zusätzlich Geschmackszellen beobachtet werden können, in denen nur der TRPM5 exprimiert wird (Abbildung 30 F und I [Pfeilspitze]).

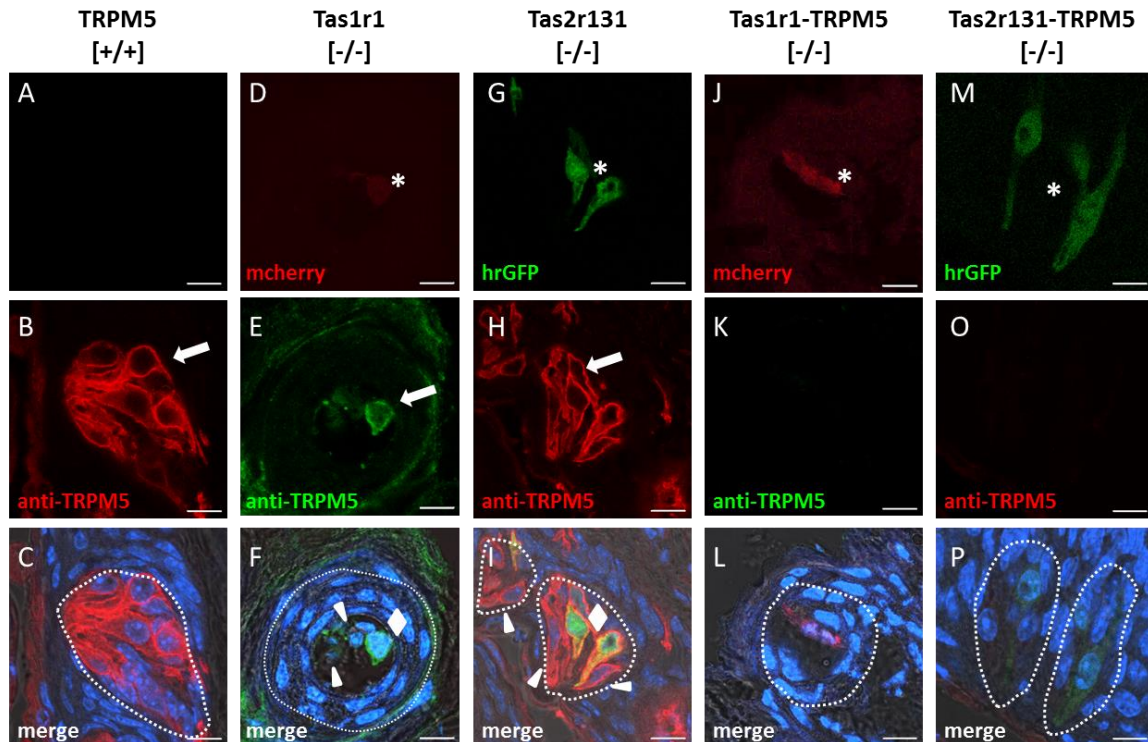


Abbildung 30: Immunhistologische Verifizierung der gemeinsamen Deletion des Tas1r1 bzw. Tas2r131 und des TRPM5. Gefrierschnitte von fixiertem Gewebe der Zungenspitze (Pilzpapille) sowie des Zungenrands (Wallpapille) der TRPM5 [+/-] (C57BL/6N), Tas1r1 [-/-] mcherry-, Tas2r131 [-/-] hrGFP-, Tas1r1-TRPM5 [-/-] und Tas2r131-TRPM5 [-/-] Maus, wurden mit einem anti-TRPM5 Antiserum behandelt. Die Antikörpermarkierung wurde entweder mit einem rot-fluoreszierenden Alexa 546 konjugierten anti-Kaninchen Sekundärantikörper aus dem Esel (TRPM5 [+/-], Tas2r131 [-/-] und Tas2r131-TRPM5 [-/-]) oder einem grün-fluoreszierenden Alexa 488 konjugierten anti-Kaninchen Sekundärantikörper aus der Ziege (Tas1r1 [-/-] und Tas1r1-TRPM5 [-/-]) visualisiert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass in einer TRPM5 [+/-]-Wallpapille eine TRPM5-Expression vorliegt [B, Pfeil]. In Pilzpapillen der Tas1r1 [-/-] mcherry Maus und Wallpapillen der Tas2r131 [-/-] hrGFP Maus können neben den Geschmacksrezeptor-Fluoreszenzsignalen [D, G; Stern] auch TRPM5-positive Zellen detektiert werden [E, H; Pfeil]. Pilzpapillen der Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Maus und Wallpapillen der Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Maus zeigen ausschließlich Geschmacksrezeptor-spezifische Signale [J, M; Stern] und keine positiven anti-TRPM5-Immunreaktionen [K, O]. In [C, F, I, L, P] sind Durchlichtaufnahmen der Geschmacksknospen mit TO-PRO-3 basierten Zellkernmarkierungen (blau) und der beiden Fluoreszenzkanäle (grün und rot) in der Überlagerung gezeigt. In der überlagerten Darstellung ist in Tas1r1 [-/-] und Tas2r131 [-/-] Geschmacksknospen eine colokalisierte Expression des Geschmacksrezeptors und des Ionenkanals zu erkennen [F, I; Raute], wobei auch einzelne, ausschließlich den TRPM5 exprimierende Geschmackszellen beobachtet werden können [F, I; Pfeilspitze]. Maßstab: 10 µm.

4.2.5 Fertilitätsanalyse von TasR-TRPM5-defizienten Mäusen

Nachdem die TasR-TRPM5 [-/-]-Mäuse erfolgreich generiert worden sind, stellte sich die Frage, ob sich diese erfolgreich verpaaren können, da für Tas1r3- α -Gustducin [-/-]-Männchen eine Infertilität beschrieben wurde (Mosinger et al., 2013). Zur Klärung der Fertilität von TasR-TRPM5 [-/-]-Tieren wurde deshalb der Züchterfolg von kontinuierlich monogam verpaarten Tas1r1-TRPM5 [-/-] bzw. Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Mäusen anhand der Reproduktionsparameter „Wurfabstand“ und „Wurfgröße“ erfasst, und diese Daten mit Ergebnissen der Zuchtanalyse von C57BL/6N-, Tas1r1 [-/-]-, Tas2r131 [-/-]- und TRPM5 [-/-]-Zuchtpaaren verglichen.

In Tabelle 8 sind die einzelnen Ergebnisse zusammengefasst und die mit Hilfe des unpaarigen T-Tests ermittelten, statistisch signifikanten Abweichungen zu den Daten der C57BL/6N-Verpaarungen angegeben. Es fiel bereits auf, dass die Tas1r1 [-/-] x [-/-]-Verpaarungen etwas größere, aber nicht signifikant größere Abstände zwischen einzelnen Würfen zeigen ($39,7 \pm$

4,4 Tage; $p = 0,197$; Tabelle 8), als für C57BL/6N-Verpaarungen beobachtet werden konnte ($33,2 \pm 2,0$ Tage). In homozygot defizienten Verpaarungen von Tas2r131 [-/-]- und TRPM5 [-/-]-Mäusen war hingegen kein auffälliger Wurfabstand zu beobachten (Tas2r131 [-/-] x [-/-]: $28,5 \pm 2,8$ Tage, $p = 0,193$; TRPM5 [-/-] x [-/-]: $34,7 \pm 2,3$ Tage; $p = 0,621$). Zunächst konnte festgestellt werden, dass Tas1r1-TRPM5 [-/-]- und Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Tiere phänotypisch gesunde Nachkommen zeugen und gebären können. Während der Abstand zwischen den Würfen der Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Zuchtpaare im Vergleich zu dem der C57BL/6N-Zuchtpaaren signifikant verlängert war ($45,2 \pm 5,9$ Tage, $p = 0,037$), konnte die Abweichung des Wurfabstands in Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Zuchtpaaren nicht festgestellt werden ($37,8 \pm 4,7$ Tage, $p = 0,318$). In Tabelle 8 sind außerdem die mittleren Wurfgrößen für jede untersuchte Verpaarung angeben. Durch statistische Berechnungen mit dem unpaarigen T-Test konnten bis auf die Tas2r131 [-/-]-Verpaarungen ($7,7 \pm 0,2$ $p = 0,039$) keine signifikanten Veränderungen bezüglich der mittleren Anzahl von Nachkommen pro Wurf erfasst werden. Allerdings fiel eine leichte Zunahme der Wurfgröße in Tas1r1 [-/-]- ($7,0 \pm 0,4$ $p = 0,402$), Tas1r1-TRPM5 [-/-]- ($6,4 \pm 0,3$ $p = 0,649$) und Tas2r131-TRPM5 [-/-]- ($6,8 \pm 0,2$ $p = 0,295$) Zuchtpaaren im Vergleich zu C57BL/6N-Zuchtpaaren auf (Tabelle 8).

Tabelle 8: Analyse der Fertilitätsparameter von TasR-TRPM5-defizienten Verpaarungen. Zur Untersuchung des Reproduktionserfolgs von TasR-TRPM5-defizienten Mäusen wurden kontinuierlich monogame C57BL/6N-, Tas1r1 [-/-]-, Tas2r131 [-/-]-, TRPM5 [-/-]-, Tas1r1-TRPM5 [-/-]- und Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Zuchtpaare gehalten und die Daten der tabellarisch aufgeführten Fertilitätsparameter erfasst. Mit Hilfe des unpaarigen T-Tests wurden signifikante Unterschiede im Wurfabstand der Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Verpaarung festgestellt ($p = 0,037$) sowie eine signifikant erhöhte Wurfgröße in Tas2r131 [-/-]-Zuchtpaaren ($p = 0,039$). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM; $p \leq 0,05$ *.

	C57BL/6N [+/+] x [+/+]	Tas1r1 [-/-] x [-/-]	Tas2r131 [-/-] x [-/-]	TRPM5 [-/-] x [-/-]	Tas1r1-TRPM5 [-/-] x [-/-]	Tas2r131-TRPM5 [-/-] x [-/-]
Wurfabstand [d]	$33,2 \pm 2,0$	$39,7 \pm 4,4$	$28,5 \pm 2,8$	$34,7 \pm 2,3$	$45,2 \pm 5,9^*$	$37,8 \pm 4,7$
Wurfgröße	$6,0 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,4$	$7,7 \pm 0,2^*$	$5,2 \pm 0,3$	$6,4 \pm 0,3$	$6,8 \pm 0,2$
Paare / Würfe	8 / 40	3 / 11	4 / 11	7/25	5 / 13	5 / 18

Im Verlaufe der Zucht der oben genannten Verpaarungsansätze wurde neben den bereits beschriebenen Fertilitätsparametern auch die Häufigkeit beobachteter Sterbefälle von Jungtieren in den ersten drei Lebenswochen protokolliert. Es war zu beobachten dass im Vergleich zu Nachkommen von C57BL/6N-Zuchtpaaren ($90,0 \pm 3,2$ %), die Jungtiere aus TRPM5 [-/-] x [-/-]-Verpaarungen eine erniedrigte Überlebensrate hatten ($76,8 \pm 7,2$ %, unpaariger T-Test: $p = 0,104$), und dass diese verringerte Überlebensrate auch in beiden TasR-TRPM5 [-/-]-Mauslinien (Tas1r1-TRPM5 [-/-]: $73,1 \pm 11,2$ %, unpaariger T-Test: $p = 0,166$; Tas2r131-TRPM5 [-/-]: $83,6 \pm 7,9$ %, unpaariger T-Test: $p = 0,458$) zu beobachten war (Abbildung 31 A). Um feststellen zu können, ob die erhöhte Sterberate in den TasR-TRPM5 [-/-]-Würfen nur durch die TRPM5-Deletion zu erklären ist, wurde zusätzlich die Anzahl verstorbener Jungtiere in Tas1r1 [-/-]- und Tas2r131 [-/-]-Verpaarungen erfasst. Für die alleinige Deletion der Geschmacksrezeptoren konnte keine erniedrigte Überlebensrate (Tas1r1 [-/-]: $95,0 \pm 2,7$ %, unpaariger T-Test: $p = 0,245$; Tas2r131 [-/-]: $97,0 \pm 3,0$ %, unpaariger T-Test: $p = 0,124$) festgestellt werden, so dass die höhere Sterblichkeit in den TasR-TRPM5 [-/-]-Nachkommen möglicherweise auf die TRPM5-Deletion zurückzuführen ist (Abbildung 31 A). Durch die Analyse der beobachteten Todesfälle fiel außerdem auf, dass es in den TRPM5 [-/-]-und

Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ - sowie Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ -Verpaarungsansätzen vermehrt zum Tod aller Nachkommen eines Wurfes kam (Abbildung 31 B). Hierfür wurde die Anzahl aller gänzlich verstorbenen Würfe zum Gesamt-Wurfaufkommen des Verpaarungsansatzes in Relation gesetzt.

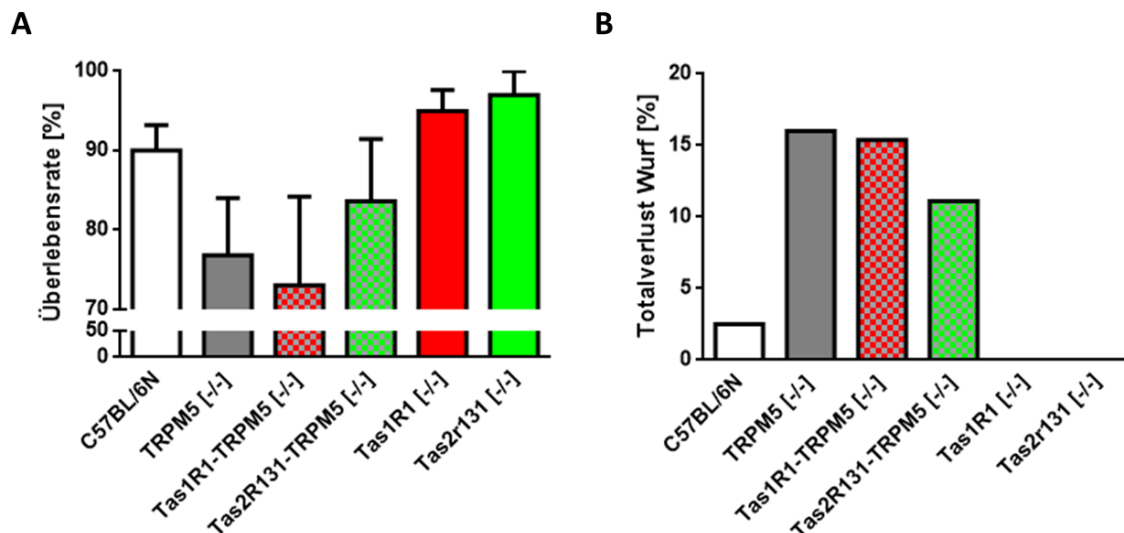


Abbildung 31: Überlebensrate der Nachkommen von TasR-TRPM5 $[-/-]$ -Zuchtpaaren. Im Zeitraum der ersten drei Lebenswochen, in denen die Jungtiere noch bei den Eltern gehalten werden, wurde die Häufigkeit der beobachteten Todesfälle analysiert. Es wurden die prozentualen Anteile der tödlichen Ereignisse für jeden Wurf berechnet und anschließend die mittlere Sterberate für alle Würfe des Verpaarungsansatzes gebildet. Dieser Mittelwert wurde von einer 100 % Überlebenswahrscheinlichkeit subtrahiert und dadurch die mittlere Überlebensrate der Jungtiere definiert. Im Vergleich zu Nachkommen aus C57BL/6N-Verpaarungen fällt auf, dass Jungtiere aus TRPM5 $[-/-]$ - und TasR-TRPM5 $[-/-]$ -Verpaarungen eine ca. 15 % verringerte Überlebensrate haben **[A]**. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant abweichend. In den gleichen Verpaarungen ist zu erkennen, dass anteilig zur Gesamt-Wurfanzahl des Verpaarungsansatzes vermehrt gesamte Würfe versterben **[B]**. Aufgrund der unauffälligen Überlebensraten unter Nachkommen von Tas1r1 $[-/-]$ - und Tas2r131 $[-/-]$ -Zuchtpaaren, ist die erhöhte Sterblichkeitsrate in TRPM5 $[-/-]$ - und TasR-TRPM5 $[-/-]$ -Zuchtansätzen möglicherweise auf die TRPM5-Deletion zurückzuführen. Anzahl beobachteter Würfe/Tiere/Todesfälle: C57BL/6N: 40/240/19; TRPM5 $[-/-]$: 25/130/19; Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$: 13/83/18; Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$: 18/132/14; Tas1r1 $[-/-]$: 8/70/3; Tas2r131 $[-/-]$: 11/8/3. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM; $p \leq 0,05$ *.

4.2.6 Funktionelle Charakterisierung von TasR-TRPM5-defizienten Spermien

Auf dem Weg des Spermiums zur Eizelle durchqueren die männlichen Keimzellen den weiblichen Genitaltrakt und erfahren währenddessen zahlreiche intrazelluläre Veränderungen, die eine Befruchtung der Oozyte ermöglichen (de Lamirande et al., 1997; Eisenbach and Giojalas, 2006). Für die Verschmelzung der beiden Keimzellen ist die Akrosomreaktion eine wichtige Voraussetzung, da durch sie hydrolytische Enzyme aus dem Akrosom freigesetzt werden, die die Glykoproteinreiche Matrix der weiblichen Gamete verdauen, so dass das Spermium zur Eizelle vordringen kann (Breitbart and Spungin, 1997). Außerdem spielt die Akrosomreaktion eine wichtige Rolle für die Bindung des Spermiums an die Eizelle, da durch sie, ein für die Gameten-Interaktion wichtiger Rezeptor, auf der nun freiliegenden inneren akrosomalen Membran präsentiert wird (Bianchi et al., 2014). In zahlreichen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass der Ca^{2+} -abhängige Vorgang der Akrosomreaktion essentiell für die männliche Fertilität ist (Liu and Baker, 1998; Oehninger et al., 1994). Wie in Kapitel 4.2.5 bereits beschrieben, wurde im

Vergleich zu C57BL/6N-Zuchtpaaren, für Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Verpaarungen ein größerer zeitlicher Abstand zwischen zwei Würfen festgestellt (Tabelle 8). Als Ursache hierfür wurde eine beeinträchtigte Akrosomreaktion in Betracht gezogen. Daher wurde die akrosomale Exozytose von TasR-TRPM5 [-/-]-Spermien untersucht und initial die Funktionalität der Exozytosemaschinerie mit Hilfe des Ca^{2+} -Ionophors A23187 geprüft (siehe 3.4.2.1). Durch die Inkubation der Spermien mit A23187 kommt es zu einem starken Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Malaisse, 1988) wodurch es, ähnlich der *Zona pellucida*-Bindung, zu einer Induktion der akrosomalen Exozytose kommt (Kirkman-Brown et al., 2002).

Für die Untersuchung der künstlich hervorgerufenen, maximalen Akrosomreaktionsrate wurden TasR-TRPM5 [-/-]-Spermien 90 min *in vitro* kapazitiert und anschließend 30 min mit 10 μM A23187 (in 0,1 % DMSO verdünnt) oder mit 0,1 % DMSO (Lösungsmittelkontrolle) inkubiert. Als Kontrollen fungierten in diesem Ansatz Spermien von C57BL/6N-, TRPM5 [-/-]-, Tas1r1 [-/-]- und Tas2r131 [-/-]-Männchen, die auf gleiche Weise behandelt wurden. Im Anschluss an die A23187- bzw. DMSO-Inkubation wurden die Spermien fixiert und mit dem Farbstoff Coomassie für die quantitative Auszählung der Akrosom-reagierten Spermien gefärbt. Zur Berechnung der prozentualen A23187-Induktionsrate wurden die ausgezählten Akrosomreaktionsraten der DMSO-inkubierten Spermien von den Akrosomreaktionsraten der A23187-stimulierten Spermien subtrahiert.

In Abbildung 32 sind die Auswertungen der quantifizierten A23187-Induktionen der Spermien unterschiedlicher Mauslinien (Anzahl der Tiere: C57BL/6N 15, TRPM5 [-/-] 9, Tas1r1 [-/-] 5, Tas2r131 [-/-] 8, Tas1r1-TRPM5 [-/-] 7, Tas2r131-TRPM5 [-/-] 11) gezeigt. Es war festzustellen, dass die allein durch A23187 ausgelöste Akrosomreaktionsrate in allen Spermien, unabhängig vom Genotyp, ähnlich ausgeprägt war und ungefähr bei 20-30 % lag. Die Deletion der gustatorischen Signalmoleküle TRPM5 sowie Tas1r1 und Tas2r131 führte somit nicht zu einer Veränderung der akrosomalen Exozytose (Abschnitt 4.1.4) (Meyer et al., 2012). Auffallend hierbei war jedoch die erhöhte A23187-Induktion der Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Spermien ($29,8 \pm 3,9$ %; unpaariger T-Test $p = 0,168$) gegenüber der der C57BL/6N-Spermien ($23,7 \pm 1,7$ %). Auch die weiteren untersuchten Spermienpopulationen reagierten weniger ausgeprägt auf das Ca^{2+} -Ionophor (TRPM5 [-/-]: $26,1 \pm 5,2$ %; Tas1r1 [-/-]: $24,5 \pm 4,8$ %; Tas2r131 [-/-]: $27,1 \pm 4,7$ %), wobei die Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Spermien die niedrigste A23187-Induktion zeigten ($18,8 \pm 3,5$ %; unpaariger T-Test $p = 0,289$) (Abbildung 32).

Durch eine verminderte Fähigkeit die Akrosomreaktion zu durchlaufen, ist gleichzeitig die Fertilität eingeschränkt (Nolan and Hammerstedt, 1997). Mit dem Befund, dass die Fähigkeit der Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Spermien zur Akrosomreaktion möglicherweise beeinträchtigt ist (Abbildung 32) und der Tatsache, dass Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Zuchtpaare signifikant längere Abstände zwischen einzelnen Würfen aufweisen (Tabelle 8), könnte eine Subfertilität in Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Tieren vorliegen. Mit der Untersuchung der Funktionalität der akrosomalen Exozytosemaschinerie wurde bereits festgestellt, dass der grundlegende, funktionelle Ablauf dieser speziellen Exozytosereaktion eingeschränkt funktioniert. Im Folgenden wurde nun geprüft, ob Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Spermien eine veränderte Stimulus-unabhängige, spontane Akrosomreaktionsrate zeigen und dadurch die Vermutung einer unzureichenden Fertilität der Männchen unterstützt wird (Oehninger et al., 1994). Parallel dazu wurden Versuchsansätze mit

Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ -Spermien durchgeführt. Für diese Untersuchung wurden Spermien aus dem caudalen Bereich des Nebenhodens isoliert und 90 min *in vitro* kapazitiert.

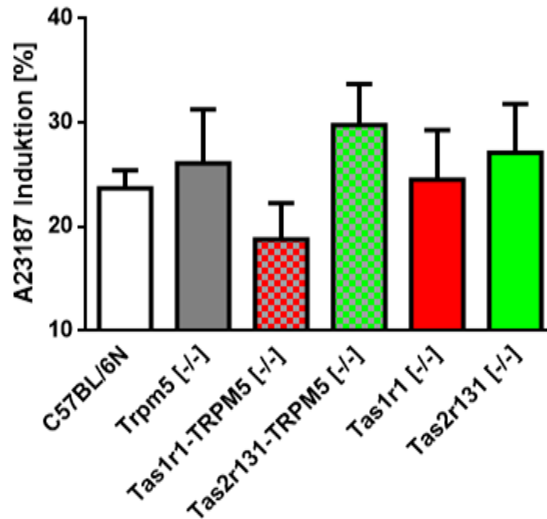


Abbildung 32: Kontrolle der akrosomalen Exozytosemaschinerie in TRPM5 $[-/-]$ - und TasR-TRPM5 $[-/-]$ -Spermien unter Verwendung des Ca^{2+} -Ionophors A23187. Spermien aus dem caudalen Abschnitt des Nebenhodens aller untersuchten Mauslinien wurden *in vitro* kapazitiert und mit dem Ca^{2+} -Ionophor A23187 bzw. dem Lösungsmittel 0,1 % DMSO stimuliert, um die Funktionalität des intrazellulären Ablaufs während der Akrosomreaktion in Abhängigkeit der gustatorischen Signalproteine zu prüfen. Quantifizierte Akrosomreaktionsraten beider Stimuli wurden voneinander subtrahiert (= A23187-Induktion) und als Säulen dargestellt. Nach der Stimulation zeigen Spermien aller Mauslinien eine A23187 induzierte Akrosomreaktion, so dass daraus geschlossen werden kann, dass die Deletion des Ionenkanals und der Geschmacksrezeptoren Tas1r1 und Tas2r131 alleine, sowie die gleichzeitige Deletion des Ionenkanals mit einem Geschmacksrezeptor keinen Einfluss auf die intrazelluläre Signaltransduktion der

Akrosomreaktion zu haben scheinen. Auffallend ist die verringerte A23187-Induktion der Akrosomreaktion in Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ -Spermien sowie die erhöhte A23187-Induktionsrate in Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ -Spermien. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von (15) C57BL/6N-, (9) TRPM5 $[-/-]$ -, (5) Tas1r1 $[-/-]$ -, (8) Tas2r131 $[-/-]$ -, (7) Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ -, (11) Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ -Tieren. Der statistische Vergleich der Daten genetisch veränderter Tiere mit Daten von C57BL/6N-Männchen erfolgte mit dem ungepaarten T-Test, $p \leq 0,05$ *.

Während der Inkubationszeit wurden Spermien in einem Abstand von 30 min der Suspension entnommen, fixiert und der akrosomale Status der Spermien quantitativ bestimmt. Als Kontrollen fungierten in diesem Ansatz die Akrosomreaktionsraten von C57BL/6N-, TRPM5 $[-/-]$ -, Tas1r1 $[-/-]$ - und Tas2r131 $[-/-]$ -Spermien. Mit Hilfe des ungepaarten T-Tests wurden die Ergebnisse statistisch mit Daten der C57BL/6N-Spermien verglichen. Abbildung 33 A fasst das Ergebnis dieser Untersuchung zusammen und dokumentiert den Anstieg des spontanen Akrosomverlusts in Abhängigkeit von der *in vitro* Kapazitierungszeit (Inoue et al., 2003; Mortimer et al., 1989). Da die Kapazitierung in den Spermien essentiell für die Fähigkeit zur Akrosomreaktion ist (Demarco et al., 2003; Visconti et al., 1999), war der Anstieg der beobachteten akrosomalen Exozytose in Spermien aller Mauslinien zu erwarten. Neben der unauffälligen Veränderung der zeitabhängigen spontanen Akrosomreaktion (Abbildung 33 A), ist in Abbildung 33 B die detaillierte, vergleichende Darstellung des spontanen Akrosomverlusts von unkapazitierten Spermien (Zeitpunkt: 0 min) und kapazitierten Spermien (Zeitpunkt: 90 min) gezeigt. Es ist zu erkennen, dass unkapazitierte TRPM5 $[-/-]$ -Spermien häufiger spontan die Akrosomreaktion durchlaufen ($9,0 \pm 2,9$ %; $p = 0,425$) als Spermien von C57BL/6N-Männchen ($6,4 \pm 1,2$ %) (Abbildung 33 C). Ein ähnliches Ergebnis konnte auch für Spermien der Tas1r1 $[-/-]$ -Mauslinie beobachtet werden ($8,4 \pm 2,8$ %; $p = 0,542$). Während die Ergebnisse der unkapazitierten TasR-TRPM5 $[-/-]$ -Spermien unauffällig waren (Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$: $4,4 \pm 0,9$ %; $p = 0,226$; Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$: $6,1 \pm 1,6$ %; $p = 0,895$), zeigte sich erneut, dass Tas2r131 $[-/-]$ -Spermien weniger häufig die spontane akrosomale Exozytose durchlaufen ($3,2 \pm 1,1$ %; $p = 0,060$) (vergleiche Abbildung 19 B) (Abbildung 33 B). Auffallend war, dass die spontane

Akrosomreaktionsrate auch in kapazitierten TRPM5 $[-/-]$ -Spermien etwas erhöht war ($19,7 \pm 2,7 \%$; $p = 0,215$) (Abbildung 33 B). Hingegen zeigten die kapazitierten Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ -Spermien ($20,4 \pm 1,7 \%$; $p = 0,065$) gegenüber den C57BL/6N-Spermien ($15,6 \pm 1,4 \%$) nun eine höhere spontane Akrosomreaktionsrate. Die kapazitierten Spermien der Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ -Männchen zeigten sogar eine signifikante Erhöhung der akrosomalen Exozytoserate ($22,1 \pm 2,6 \%$; $p = 0,048$) gegenüber Spermien von C57BL/6N-Männchen. Wie bereits publiziert, konnte die erhöhte spontane Akrosomreaktionsrate der Tas1r1 $[-/-]$ -Spermien ($27,0 \pm 19,5 \%$; $p = 0,265$) auch hier dargestellt werden (Meyer et al., 2012), wohingegen die Tas2r131 $[-/-]$ -Spermien ($15,6 \pm 1,8$; $p = 0,989$), wie bereits in Abschnitt 4.1.4 beschrieben, keinen Unterschied zu C57BL/6N-Spermien zeigten (Abbildung 33 B).

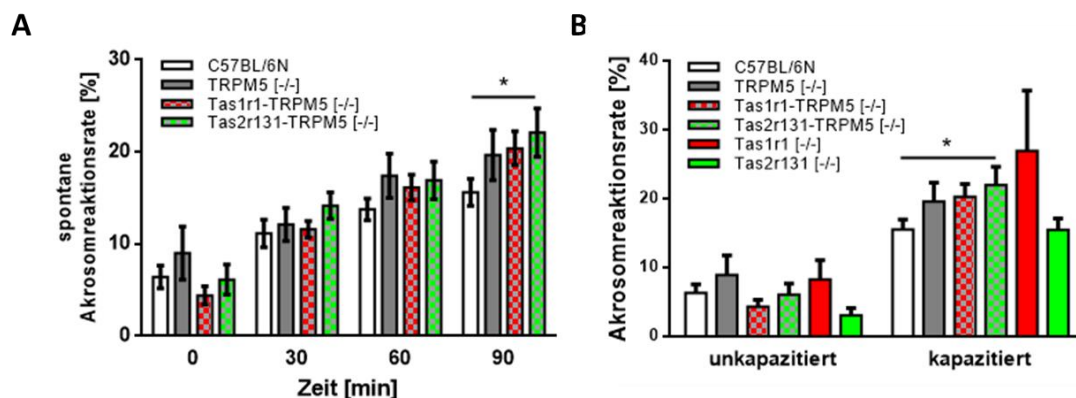


Abbildung 33: Spontane Akrosomreaktionsrate in TRPM5-defizienten- und TasR-TRPM5-defizienten Spermien. Zur Analyse der spontanen Akrosomreaktionsrate wurden von epididymalen Spermien der Mauslinien C57BL/6N, TRPM5 $[-/-]$, Tas1r1 $[-/-]$, Tas2r131 $[-/-]$, Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ und Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ die spontanen Verluste des Akrosoms über die Zeit, als Auswirkung auf die Inkubation in einem Kapazitierungsbuffer untersucht. Der zeitabhängige Verlauf der spontanen Akrosomreaktionsrate kapazitierender Spermien von Tas1r1 $[-/-]$ - und Tas2r131 $[-/-]$ -Männchen ist bereits publiziert (Meyer et al, 2012) oder in Abschnitt 4.1.4 beschrieben und darum hier nicht gezeigt. **[A]** Für die Spermien aller untersuchter Mauslinien kann ein zeitabhängiger, kontinuierlich ansteigender Verlauf der Akrosomreaktion beobachtet werden. In **[B]** ist die detaillierte Darstellung der spontanen Akrosomreaktion in unkapazitierten (0 min), sowie *in vitro* kapazitierten (90 min) Spermien gezeigt. Sowohl unkapazitierte TRPM5 $[-/-]$ - als auch Tas1r1 $[-/-]$ -Spermien zeigen einen nicht signifikanten erhöhten spontanen Verlust des Akrosoms. An TasR-TRPM5 $[-/-]$ -Spermien kann eine gleichbleibende (Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$) bzw. etwas reduzierte Akrosomreaktionsrate (Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$) beobachtet werden. In allen *in vitro* kapazitierten Spermienpopulationen kann eine deutlich erhöhte spontane Akrosomreaktionsrate gezeigt werden. Spermien von TRPM5 $[-/-]$ - und TasR-TRPM5 $[-/-]$ -Männchen haben stets eine höhere akrosomale Exozytoserate als C57BL/6N-Spermien, wobei in Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ -Spermien signifikant häufiger der spontane Verlust des Akrosoms zu beobachten ist ($p = 0,048$). Spermien von Tas1r1 $[-/-]$ -Männchen zeigen erneut eine höhere spontane Akrosomreaktionsrate als C57BL/6N-Spermien und Tas2r131 $[-/-]$ -Spermien. Anzahl der in die Untersuchung eingegangenen Tiere und damit unabhängigen Spermienpräparationen: C57BL/6N (15), TRPM5 $[-/-]$ (9), Tas1r1 $[-/-]$ (5), Tas2r131 $[-/-]$ (8), Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ (7), Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ (11). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM; $p \leq 0,05$ *.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass Spermien von TRPM5 $[-/-]$ -Männchen über eine funktionierende akrosomale Exozytosemaschinerie verfügen und sowohl im unkapazitierten als auch kapazitierten Zustand eine leichte, aber nicht signifikant erhöhte, spontane Akrosomreaktion zeigen (Abbildung 27 B + C). Diese Beobachtung könnte auf das etwas erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Level in unkapazitierten TRPM5 $[-/-]$ -Spermien, aber auch auf das signifikant erhöhte Ca^{2+} -Level in kapazitierten TRPM5 $[-/-]$ -Spermien zurückzuführen sein (Abbildung 27 A). Da für Tas1r1-defiziente Spermien bereits eine erhöhte spontane akrosomale Exozytoserate und

in unkapazitierten Spermien ein erhöhtes basales Ca^{2+} -Level beobachtet wurde (Meyer et al., 2012), wird es interessant sein zu prüfen, ob in Spermien von Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Männchen ein additiver Effekt hinsichtlich der Ca^{2+} -Konzentration festzustellen ist, und wie sich die gemeinsame Deletion des Tas2r131 und des TRPM5 auf das intrazelluläre, basale Ca^{2+} -Level in Spermien auswirkt. Um zusätzlich die Rolle der gustatorischen Geschmacksproteine in der Akrosomreaktion besser zu verstehen, sind neben Messungen des basalen Ca^{2+} -Levels in TasR-TRPM5 [-]-Spermien auch Quantifizierungen der basalen cAMP-Konzentration und Analysen der *Zona pellucida*-induzierten Akrosomreaktion in TRPM5 [-]-, Tas1r1-TRPM5 [-]- und Tas2r131-TRPM5 [-]-Spermien wichtig.

4.2.7 Detaillierte Analysen der TRPM5- und TasR-TRPM5-defizienten Spermien und ihrer testikulären Genese

Eine Teratozoospermie bezeichnet die krankhafte morphologische Veränderung von Spermien, die mit einer eingeschränkten Spermienqualität und einer daraus resultierenden reduzierten Fertilitätsrate einhergeht (Liu and Baker, 1998; Oehninger et al., 1994). Aufgrund der signifikant verlängerten Zeitspanne, die zwischen den Würfen in Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Verpaarungen zu beobachten ist und der morphologischen Auffälligkeiten in Tas1r3- α -Gustducin [-]-Spermien (Mosinger et al., 2013) wurden die Spermien von TRPM5 [-/-]- und TasR-TRPM5[-/-]-Männchen hinsichtlich ihrer Morphologie untersucht.

Wie bereits für die Tas2r131 Spermienpopulationen durchgeführt (Abschnitt 4.1.3), wurde auch für diese Spermien die Fläche des Kopfsegments vermessen. Hierfür wurden Coomassie-gefärbte Ausstriche von C57BL/6N-, TRPM5 [-]- und TasR-TRPM5 [-]-Spermien angefertigt und mikroskopisch mit dem Programm *Cell^A* (Olympus, Hamburg) detailliert untersucht. Im direkten Vergleich mikroskopisch aufgenommener Spermienköpfe von C57BL/6N- und TRPM5 [-/-]-Männchen ist zu erkennen, dass die Köpfe der genetisch veränderten TRPM5 [-]-Spermien vergrößert erscheinen (

Abbildung 34). Quantitative Analysen der computergestützten Flächenvermessungen von 50 C57BL/6N-, TRPM5 [-]- und Tas2r131-TRPM5 [-]-Spermien sowie von 40 Tas1r1-TRPM5 [-]-Spermien zeigten, dass im Vergleich zu C57BL/6N-Spermien ($19,36 \pm 0,25 \mu\text{m}^2$) nicht nur die Kopffläche der TRPM5 [-]-Spermien ($22,72 \pm 0,20 \mu\text{m}^2$; $p = 6,17 \cdot 10^{-13}$) signifikant vergrößert ist, sondern auch die der TasR-TRPM5 [-]-Spermien (Tas1r1-TRPM5 [-]: $21,93 \pm 0,38 \mu\text{m}^2$ $p = 5,18 \cdot 10^{-8}$; Tas2r131-TRPM5 [-]: $22,17 \pm 0,28 \mu\text{m}^2$ $p = 2,44 \cdot 10^{-9}$).

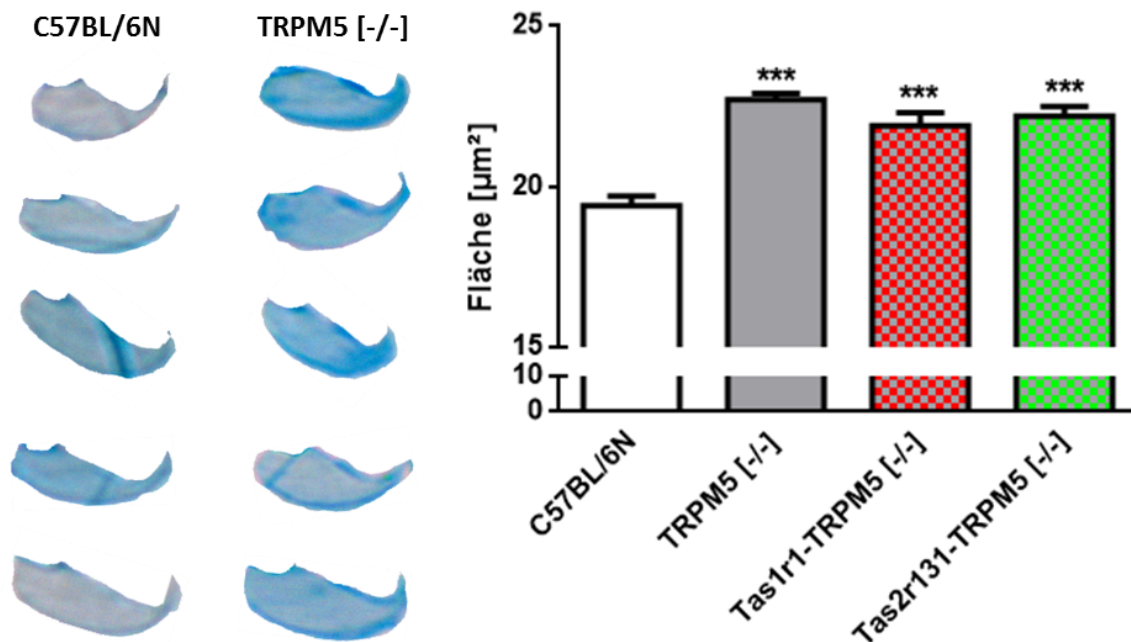


Abbildung 34: Vergleich der Kopfgrößen von TRPM5-defizienten- und TasR-TRPM5-defizienten Spermien. Isolierte epididymale Spermien von TRPM5 [-/-]- und TasR-TRPM5 [-/-]-Männchen wurden fixiert und auf Objektträgern ausgestrichen und im angetrockneten Zustand mit Coomassie-Färbelösung behandelt. Von mikroskopischen Aufnahmen einzelner Spermien sind exemplarisch ausgeschnittene Köpfe von C57BL/6N- und TRPM5 [-/-]-Spermien gezeigt. Die Fläche von 50 C57BL/6N-, TRPM5 [-/-]- und Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Spermien sowie 40 Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Spermien wurde mit Hilfe einer Mikroskop-Software bestimmt und die Werte über den unpaarigen T-Test mit den Flächenberechnungen von C57BL/6N-Spermienköpfen statistisch verglichen. In allen drei genetisch veränderten Spermienpopulationen kann eine signifikante Zunahme der Spermienkopffläche festgestellt werden. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM; $p \leq 0,05$ *.

Eine derart veränderte Kopfmorphologie könnte die Befruchtungskompetenz der Spermien beeinflussen und damit den größeren zeitlichen Abstand zwischen den Würfen von Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Zuchtpaaren erklären. Um der Frage nach der Fertilität der genetisch veränderten TRPM5 [-/-]- und TasR-TRPM5 [-/-]-Männchen weiterhin nachzugehen, wurden neben dem Körper- und Hodengewicht auch die Anzahl motiler epididymaler Spermien aus dem caudalen Abschnitt des Nebenhodens bestimmt. Zur Erfassung dieser Parameter wurden die Männchen direkt nach der zervikalen Dislokation gewogen und mit Hilfe des Körpergewichts und des Gewichts beider Hoden das relative Hodengewicht (Anteil des Hodengewichts am Körpergewicht) bestimmt. Für die Spermienanzahlbestimmung wurden die caudalen Abschnitte der Nebenhoden in eine Petrischale mit 2 ml Puffer überführt und einige Male eingeschnitten, so dass die motilen Spermien in das sie umgebende Medium schwimmen konnten. Nach einer Inkubationsphase von mindestens 30 min bei 37 °C wurde eine 1:40 Verdünnung der Spermien angesetzt, und die Anzahl der Spermien/ml mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

In Tabelle 9 sind die erfassten Daten für 80-105 Tage alte adulte Männchen der TRPM5 [-/-]- und TasR-TRPM5 [-/-]-Mauslinien zusammengefasst. Für vergleichende Analysen sind außerdem die Daten der C57BL/6N-, Tas1r1 [-/-]- und Tas2r131 [-/-]-Mauslinien angegeben und die Ergebnisse der statistischen Analyse mit Hilfe des unpaarigen T-Tests im Vergleich zum C57BL/6N-Phänotyp gezeigt. Männchen, die eine homozygot defiziente Geninformation für das

Trpm5-Gen haben, zeigen eine signifikante Reduzierung des Körpergewichts gegenüber C57BL/6N-Männchen ($p = 0,017$). Dieser Befund bestätigt bereits publizierte Daten und ist auf eine erhöhte Glukose-Toleranz zurückzuführen (Larsson et al., 2015). Hinsichtlich des relativen Hodengewichts und der Anzahl motiler Spermien ist jedoch kein auffallender Phänotyp in TRPM5 $[-/-]$ -Männchen zu beobachten. Für Tas1r1 $[-/-]$ -Männchen konnte hingegen ein signifikant höheres relatives Hodengewicht ($p = 0,007$) im Vergleich zu C57BL/6N-Männchen beobachtet werden. Der größere Anteil des Hodengewichts am Körpergewicht in Tas1r1 $[-/-]$ -Männchen hat sich jedoch nicht auf die Anzahl der Spermien ausgewirkt, da diese unverändert ist. Während der Phänotyp der untersuchten Tas2r131 $[-/-]$ -Männchen unauffällig war, konnte für die Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ -Männchen hingegen ein etwas reduziertes relatives Hodengewicht und eine verringerte Spermienanzahl ($p = 0,080$) festgestellt werden. Diese Beobachtung konnte nicht in Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ -Männchen festgestellt werden, die im Vergleich zu C57BL/6N-Männchen sogar ein signifikant erhöhtes relatives Hodengewicht ($p = 0,007$) und eine größere Anzahl an Spermien aufwiesen. Im Vergleich zu C57BL/6N-, und Tas1r1 $[-/-]$ - bzw. Tas2r131 $[-/-]$ -Männchen konnte sowohl für Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ -, als auch Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ -Männchen ein reduziertes Körpergewicht bestimmt werden, das in männlichen Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ -Tieren signifikant unterschiedlich war ($p = 0,020$). Möglicherweise ist diese Beobachtung auf die Konsequenzen der TRPM5-Deletion zurückzuführen, da diese eine direkte Auswirkung auf das Körpergewicht hat (Larsson et al., 2015).

Tabelle 9: Auswirkungen der Deletion gustatorischer Signalproteine auf die männlichen Reproduktionsorgane. Von den angegebenen Genotypen der unterschiedlichen Mauslinien wurden Männchen direkt nach der Tötung gewogen und mit Hilfe des Körper- und Hodengewichts das relative Hodengewicht berechnet. Die Spermienanzahl wurde anhand von entnommenen und eingeschnittenen caudalen Abschnitten des Nebenhodens bestimmt. Auffallend ist das signifikant reduzierte Körpergewicht der TRPM5 $[-/-]$ -Männchen, deren relatives Hodengewicht und Spermienanzahl jedoch ähnlich zu C57BL/6N sind. Tas1r1 $[-/-]$ -Männchen zeigen ein signifikant erhöhtes relatives Hodengewicht, das aber keinen Einfluss auf die Spermienanzahl hat. Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ -Männchen haben ein reduziertes relatives Hodengewicht und eine reduzierte Anzahl an Spermien. Konträre Effekte scheint die Deletion auf Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ -Männchen zu haben, für die ein höheres relatives Hodengewicht und eine höhere Spermienanzahl erfasst werden konnte. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM; unpaariger statistischer T-Test: $p \leq 0,05$ *.

	C57BL/6N [+/+]	TRPM5 [-/-]	Tas1r1 [-/-]	Tas2r131 [-/-]	Tas1r1-TRPM5 [-/-]	Tas2r131-TRPM5 [-/-]
Körpergewicht [g]	28,0 \pm 0,4	26,8 \pm 0,3 *	27,6 \pm 0,6	28,4 \pm 0,8	27,1 \pm 0,5	26,5 \pm 0,5 *
Rel. Hodengewicht [%]	0,572 \pm 0,02	0,591 \pm 0,01	0,688 \pm 0,02 **	0,632 \pm 0,02	0,53 \pm 0,02	0,679 \pm 0,03 **
Spermienanzahl *10 ⁶	28,2 \pm 1,6	29,2 \pm 1,1	27,3 \pm 4,0	32,6 \pm 2,1	22,7 \pm 2,4	32,3 \pm 1,6
n	16	49	6	11	9	10

Die bezüglich der Reproduktionsorgane untersuchten Männchen waren 80-105 Tage alt. Um eine altersbedingte Veränderung der Spermienanzahl auszuschließen und sicherzustellen, dass die beobachtete verringerte Spermienanzahl in Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ -Männchen unabhängig vom Alter beobachtet werden kann, wurde anhand der gleichen Daten zusätzlich eine altersabhängige Analyse der Spermienanzahl durchgeführt (Abbildung 35). Die Untersuchung zeigt, dass selbst unter Einschluss des Alterskriteriums Männchen mit einer Deletion der Tas1r1- und TRPM5-codierenden Sequenz eine verringerte Spermienanzahl haben.

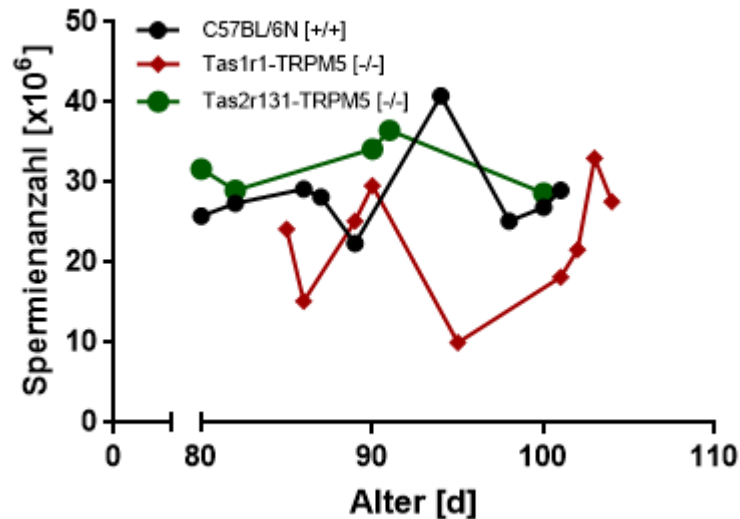


Abbildung 35: Altersabhängige Spermienanzahl-Bestimmung in TasR-TRPM5 $[-/-]$ -Männchen. Gezeigt sind die Spermienanzahlen von Männchen der C57BL/6N-, Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ - und Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ -Mauslinien in Abhängigkeit vom Alter (80-105 Tage). Trotz der Schwankungen ist zu erkennen, dass Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ -Männchen im Vergleich zu den beiden anderen Mauslinien eine geringere Anzahl an Spermien haben. Gezeigt sind Daten von 16 C57BL/6N-, 9 Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ - und 10 Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ -Männchen.

Eine derartige Reduzierung der Spermienanzahl in Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ -Männchen kann auf eine Störung der Spermatogenese zurückzuführen sein, wodurch entweder weniger Spermien gebildet werden, oder wodurch vermehrt missgebildete Spermien entstehen, die absterben, bevor sie in den Nebenhoden gelangen. Um initial festzustellen, ob es in Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ -Hoden zu einer Ansammlung toter Zellen kommt, die auf abgestorbene Keimzellen zurückzuführen sind, wurde die Häufigkeit der apoptotischen Ereignisse in Paraffinschnitten des Hodens bestimmt (siehe 3.4.1.3). Zur Visualisierung der apoptotischen Zellen wurde das *In situ cell death detection kit, TMR red* (Roche) angewandt, mit dem rot-fluoreszierende dNTPs an Doppelstrangbrüche, die auf den Vorgang der Apoptose hindeuten, enzymatisch eingebaut werden (Darzynkiewicz et al., 2008). Die roten Fluoreszenzsignale konnten anschließend an einem Fluoreszenzmikroskop in Relation zur beobachteten Tubulianzahl quantifiziert werden. Hierfür wurden in vier gleich großen Blickfeldern die Anzahl der *Tubuli seminiferi* blind bestimmt und dann für jeden Tubulus die beobachtete Menge an rot-fluoreszierenden apoptotischen Zellen festgehalten. Pro untersuchten Tier wurden dazu vier Hodenschnitte unterschiedlicher Schnittebenen analysiert.

In Abbildung 36 sind beispielhafte Aufnahmen TUNEL-gefärbter Hodenschnitte von den jeweils darüber angegebenen Genotypen gezeigt und mit Pfeilen die apoptotischen Zellen hervorgehoben. Zur Visualisierung der Zellkerne wurden die Hodenschnitte mit dem Kernfarbstoff DAPI (blau) behandelt. Als Präparate, die mit Hilfe des unpaarigen T-Test statistisch verglichen wurden, sind Gewebeschnitte eines C57BL/6N-Hodens verwendet worden, in dem vereinzelte apoptotische Zellen im basalen, tubulären Bereich zu beobachten sind. Eine vergleichbare, jedoch häufiger auftretende Markierung apoptotischer Zellen ist in Hodenschnitten von TRPM5 $[-/-]$ -Männchen festzustellen ($p = 0,275$). Signifikant mehr TUNEL-markierter Zellen können hingegen in Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ -Hodenschnitten erfasst werden ($p = 0,012$). Der gleiche Phänotyp ist auch für Hodengewebeschnitte von Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ -

Männchen zu beobachten, jedoch nicht signifikant abweichend von der Häufigkeit apoptotischer Zellen pro Tubulus in C57BL/6N-Hodenschnitten ($p = 0,147$). Da bereits für Tas1r1 [-/-]-Männchen eine signifikant höhere Apoptoserate im Hoden festgestellt wurde (Meyer et al., 2012), jedoch nicht für Tas2r131 [-/-]-Hodengewebe (Abschnitt 4.1.3), ist womöglich das erhöhte Auftreten apoptotischer Zellen auf die TRPM5-Deletion zurückzuführen, wobei die höchste beobachtete Apoptoserate in den *Tubuli seminiferi* von Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Männchen einen additiven Effekt der Tas1r1- und TRPM5-Deletion widerspiegeln könnte.

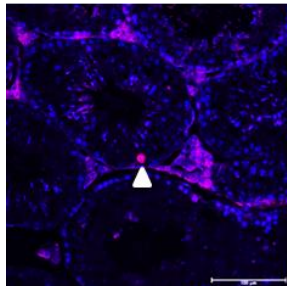
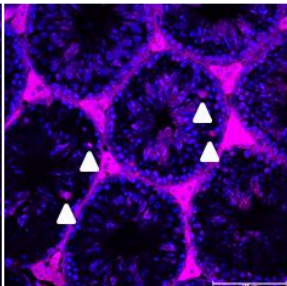
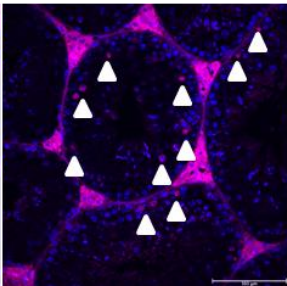
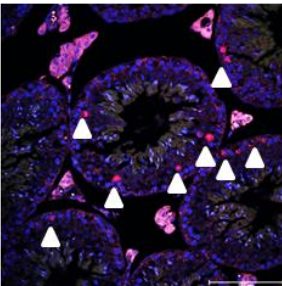
C57BL/6N [+/+]	TRPM5 [-/-]	Tas1r1-TRPM5 [-/-]	Tas2r131-TRPM5 [-/-]
0,63 ± 0,3	0,79 ± 0,2	1,08 ± 0,2*	1,00 ± 0,2
			

Abbildung 36: Quantifizierung apoptotischer Zellen in TRPM5- und TasR-TRPM5-defizienten Hodenschnitten. An Paraffinschnitten des Hodens angegebener Genotypen wurden apoptotische Zellen mit Hilfe des *In situ cell death detection kits*, TMR red (Roche) enzymatisch rot-fluoreszierend markiert. Derart gekennzeichnete Zellen [Pfeilspitze] wurden anschließend mikroskopisch gezählt, und die Anzahl apoptotischer Zellen pro Tubulus ausgewertet. Gezeigt sind die mittleren Apoptoseraten pro Tubulus und beispielhafte Aufnahmen apoptotischer Ereignisse in Hodengewebe. Blau markiert sind hierbei DAPI-gefärbte Zellkerne. In TRPM5 [-/-]-Hodenschnitten ist ein leichter, jedoch nicht signifikant erhöhter Anstieg der Apoptoserate zu erkennen. Dies wird durch die Aufnahme der vermehrt auftretenden apoptotischen Zellen im basalen Bereich der *Tubuli seminiferi* veranschaulicht. Die meisten Vorkommnisse des programmierten Zelltods sind in TasR-TRPM5 [-/-]-Hodenschnitten zu beobachten. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM; unpaariger statistischer T-Test: $p \leq 0,05$ *. Maßstab: 100 µm.

In Hodenschnitten aller untersuchten Mauslinien sind apoptotische Ereignisse hauptsächlich in den basalen Regionen des Keimdrüsengewebes zu finden, wo die frühen Stadien der Spermatogenese stattfinden. Obwohl in Tas2r131-TRPM5-defizienten Männchen zwar eine erhöhte Apoptoserate bestimmt werden konnte, während die Spermienanzahl unauffällig war, könnten die vermehrt auftretenden apoptotischen Zellen in Hoden von Tas1r1-TRPM5 [-/-]-Tieren eine Ursache für die stark reduzierte Spermienmenge darstellen (Tabelle 9).

Um zu überprüfen ob eine morphologische Strukturveränderung des Hodengewebes bereits Hinweise für eine gestörte Spermatogenese gibt, wurden HE-gefärbte Paraffin-Hodenschnitte auf mögliche Auffälligkeiten hin untersucht. In Abbildung 37 sind beispielhafte histologische Aufnahmen von coronalen Hodenschnitten von C57BL/6N-, TRPM5 [-/-]-, Tas1r1-TRPM5 [-/-]- und Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Männchen gezeigt. In allen Gewebeschnitten sind einzelne Hodentubuli mit den darin befindlichen Sertoli Zellen und Keimzellen aller Spermatogenesestadien zu erkennen. Unabhängig vom Genotyp sind im Lumen jedes Tubulus reife Spermatozoen sichtbar, so dass eine reduzierte Spermienbildung in Tas1r1-TRPM5 [-/-]-

Männchen (Abbildung 37 C) nicht direkt bemerkbar ist. Zwischen den einzelnen *Tubuli seminiferi* befindet sich der Interstitialraum mit den darin befindlichen Leydig Zellen, die für die Synthese des Spermien-bildenden Steroidhormons Testosteron wichtig sind (Abbildung 37, Pfeil). Bis auf den Effekt des Fixativums, das in Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ -Hodenpräparaten zum instabilen Gewebeerhalt und somit zu Rissen im Interstitialraum (Abbildung 37 D, Stern) führte, sind in keinem der untersuchten Hodengewebe unterschiedlichen Genotyps Auffälligkeiten in Bezug auf die Ausprägung des Interstitialraums zu beobachten. Zusätzliche Gutachten dreier unabhängiger Spezialisten (Prof. Dr. Gerd Aumüller, Prof. Dr. Martin Bergmann, Prof. Dr. med. Artur Mayerhofer) konnten ebenfalls keine gravierenden testikulären Dismorphologien aufgrund der Deletion gustatorischer Signalproteine feststellen.

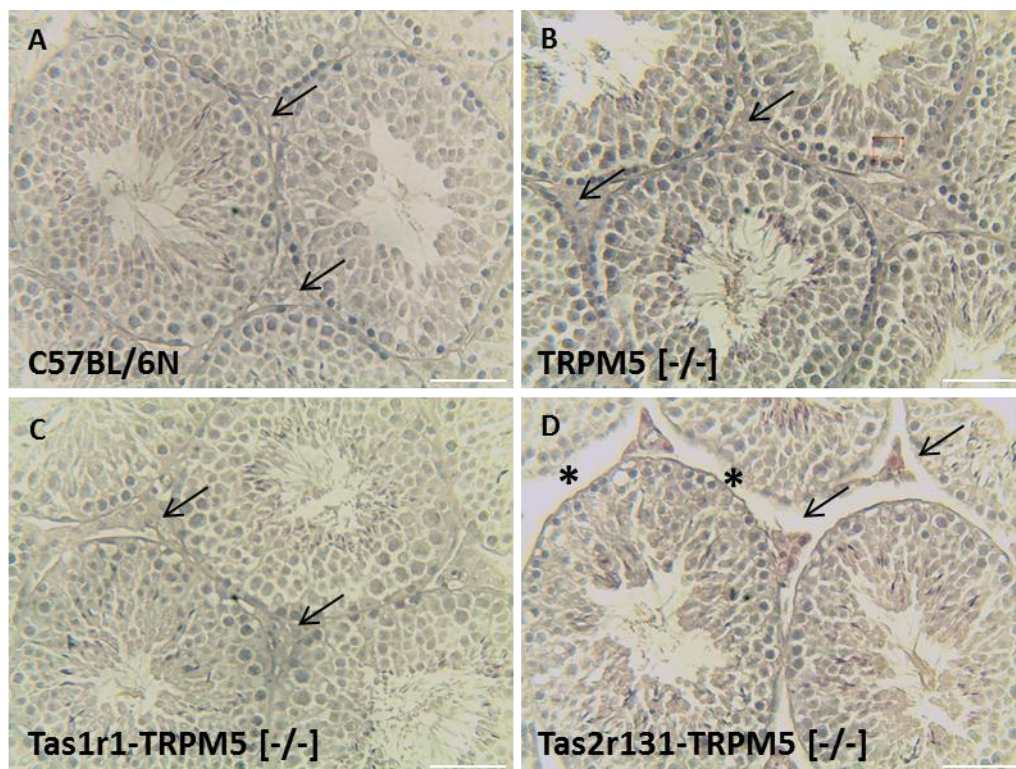


Abbildung 37: Vergleichende HE-Färbungen von C57BL/6N, TRPM5-defizienten und TasR-TRPM5-defizienten Hodengewebeschnitten. Zur strukturellen Analyse wurden mit Hilfe des HE-Färbeverfahrens Zellkerne und Zytoplasma an Paraffinschnitten von Hoden eines C57BL/6N- [A], TRPM5 $[-/-]$ - [B], Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ - [C] und Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ - [D] Männchens sichtbar gemacht. Es sind einzelne, angeschnittene Hodentubuli und der sie umgebende Interstitialraum mit Leydig Zellen [Pfeil] zu erkennen. Es sind keine auffälligen morphologischen Unterschiede aufgrund der Deletion des TRPM5-Ionenkanals [B], oder der gemeinsamen Deletion des Tas1r1-Rezeptors und des TRPM5 [C] bzw. des Tas2r131-Rezeptors und des TRPM5 [D] festzustellen. Das Auseinanderklaffen des Interstitialraums in Tas2r131-TRPM5 $[-/-]$ -Hodenschnitten ist auf einen fixativen Effekt zurückzuführen [D, Stern]. Maßstab: 50 μ m.

In den Untersuchungen von TRPM5-defizienten und TasR-TRPM5-defizienten Tieren liegen die auffälligsten Befunde für die Tas1r1-TRPM5 $[-/-]$ -Mauslinie vor: verlängerter zeitlicher Abstand zwischen den Würfen, signifikant erhöhte Apoptoserate in basalen Zellen der *Tubuli seminiferi* und stark reduzierte Spermienanzahlen. Da die zellulären Effekte im Männchen beobachtet wurden und noch nicht geklärt ist, ob der veränderte Wurfabstand auf das Männchen oder das

Weibchen zurückzuführen ist, oder ob es sich hierbei um eine Auswirkung beider Geschlechter handelt, wurde im Weiteren geprüft, ob den beobachteten Fertilitätsstörungen der Männchen eine Störung der zentralen hormonellen Spermienbildung zugrunde liegt (Anawalt, 2013; Devoto et al., 2000; Giwerzman et al., 2007).

Ein wichtiges Sexualhormon des männlichen Geschlechts ist das Steroidhormon Testosteron. Wird dieses Hormon nicht oder nicht ausreichend gebildet, kommt es zu einer spermatogenetischen Insuffizienz und infolge dessen zur eingeschränkten Fertilität. In einer vorangegangenen Publikation (Meyer et al., 2012) und in Abschnitt 4.1.3 wurden Befunde gezeigt, die belegen, dass die Deletion des Umami-Rezeptors (Tas1r1) bzw. des Bitterrezeptors (Tas2r131) keinen Einfluss auf die Testosteronsynthese zu haben scheint. Um zu prüfen, ob die Deletion der codierenden Sequenz des TRPM5-Ionenkanals, der auch in der Hypophysenregion des Gehirns exprimiert wird (mündliche Korrespondenz mit Prof. Böhm, Universitätsklinikum des Saarlandes; Daten nicht veröffentlicht), Auswirkungen auf die Testosteronsynthese im Männchen hat, wurde initial die Testosteronkonzentration im Plasma von adulten TRPM5 [-/-]-Männchen bestimmt. Um potentielle Schwankungen, die dem circadianen Rhythmus unterliegen, auszuschließen, wurde immer zur gleichen Zeit am Vormittag des Versuchstages durch eine Punktion des Herzens Blut einer just getöteten Maus entnommen und das Plasma daraus gewonnen (Abschnitt 3.2.4). Die bis zur Untersuchung bei -80°C gelagerten Plasmaproben wurden gemeinsam mit Vergleichsproben von C57BL/6N-Männchen an den Kooperationspartner Herrn Adamski (Helmholtz Zentrum, Oberschleißheim, München) übermittelt, wo sie massenspektrometrisch analysiert wurden (Abschnitt 3.4.6). Die Ergebnisse der Plasmaproben von 16 C57BL/6N- und 17 TRPM5 [-/-]-Männchen zeigten, dass die Testosteronkonzentration in sieben Proben von 17 untersuchten TRPM5 [-/-]-Männchen unterhalb der technischen Nachweisgrenze lagen ($< 0,400$ nmol/l), während in nur drei der 16 C57BL/6N-Proben die Nachweisgrenze nicht erreicht wurde. Um diesen Befund in die Auswertung aufzunehmen, ist eine Berechnung des arithmetischen Mittelwerts nicht sinnvoll, da die Berechnung der durchschnittlichen Testosteronkonzentration über den Mittelwert nicht der realen Werteverteilung entspricht (Lange and Bender, 2007). Um die bestimmten Konzentrationsergebnisse besser interpretieren zu können, wurde daher aus den Messwerten der Median gebildet, der die Mitte einer Stichprobengröße widerspiegelt und daher unbeeinflusst von Extremwerten ist. Die Berechnung des Medians und die anschließende Anwendung des statistischen Mann-Whitney U Tests ergaben eine signifikante Reduzierung der Testosteronkonzentration in TRPM5 [-/-]-Männchen (C57BL6/N = 1,2 nmol/l; TRPM5 [-/-] = 0,5 nmol/l; $p = 0,047$) (Abbildung 38).

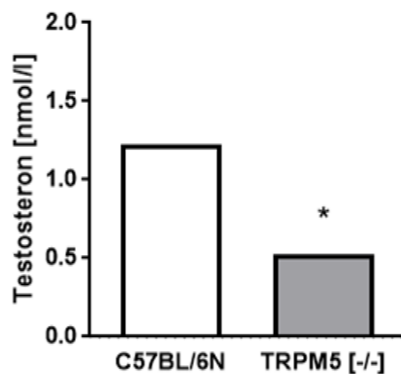


Abbildung 38: Massenspektrometrische Bestimmung der Testosteronkonzentration in Plasma TRPM5-defizienter Männchen. Direkt nach Tötung des Tieres wurde aus der rechten Herzkammer Vollblut durch eine Punktion entnommen und durch Zentrifugation das Plasma gewonnen. Von 16 C57BL/6N- und 17 TRPM5 [-/-]-Männchen wurde die Konzentration des Sexualhormons Testosteron im Plasma über die LC-MS/MS -Methode bestimmt. Die Analyse ergab, dass die Testosteronkonzentration in drei C57BL/6N- bzw. sieben TRPM5 [-/-]-Proben unterhalb der Nachweisgrenze lag ($< 0,400$ nmol/l). Um alle Werte in die Auswertung einzubeziehen, wurde aus allen Messwerten einer Mauslinie der Median gebildet und der statistische Mann-Whitney U Test angewendet. Im Plasma von TRPM5 [-/-]-Männchen wurde eine signifikant geringere Konzentration des Spermienbildenden Hormons nachgewiesen, als in C57BL/6N-Plasma. Gezeigt ist der Median: $p \leq 0,05$ *.

Zusammenfassend für die Befunde der Untersuchungen an TRPM5-defizienten und TasR-TRPM5-defizienten Mäusen kann festgehalten werden, dass zusätzlich zur G-Protein-Untereinheit α -Gustducin und den Geschmacksrezeptoren Tas1r1 und Tas2r131 der gustatorische Ionenkanal TRPM5 im Hodengewebe und den Spermien exprimiert wird. Die Deletion der *Trpm5*-codierenden Sequenz führt zwar zu keiner prägnanten Fertilitätsstörung, jedoch lässt sich anhand der vorgestellten Ergebnisse belegen, dass der gemeinsame genetische Verlust des Tas1r1 und des TRPM5 zum veränderten Wurfabstand bei Zuchtpaaren, einer veränderten Spermienmorphologie, einer erhöhten Rate apoptotischer Ereignisse im Hodengewebe und einer starken Reduzierung der Spermienanzahl führt. Während nicht alle dieser Folgen in Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Tieren festgestellt werden können, konnte gezeigt werden, dass auch im Hoden der Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Männchen eine gesteigerte Apoptoserate vorliegt, und dass für die ebenfalls vergrößerten Spermien nach dem Vorgang der *in vitro* Kapazitierung eine deutlich erhöhte spontane Akrosomreaktionsrate erfasst werden kann. Von großem Interesse sind außerdem die begonnenen hormonellen Untersuchungen, die in TRPM5 [-/-]-Männchen eine stark verringerte Testosteronkonzentration ergaben. Könnte diese Beeinträchtigung der Steroidhormonsynthese oder -abbau auch in Tas1r1-TRPM5 [-/-]-, oder Tas2r131-TRPM5 [-/-]-Männchen festgestellt werden, wäre erstmals ein Beleg dafür erbracht worden, dass gustatorische Signalmoleküle Einfluss auf die zentral gesteuerte Hormonregulation haben könnten.

4.3 MUPP1 und OMP: ektope Expression chemosensorisch-assoziiierter Proteine

Der Zeitraum zwischen der chemosensorischen Detektion eines Stimulus und der kognitiven Verarbeitung liegt im Millisekunden Bereich. Für eine derart schnelle Reaktion müssen sämtliche Reaktionsabfolgen ohne Zeitverzögerung erfolgen. Obwohl die Funktion der meisten Proteine, die an der olfaktorischen (Kaupp, 2010) und gustatorischen (Chaudhari and Roper, 2010) Signalkaskade beteiligt sind, weitestgehend verstanden ist (Mombaerts, 2004), gibt es weitere Proteine, die einen Einfluss auf die Reaktionszeit haben, deren exakte Aufgabe bisher aber nicht gänzlich aufgeklärt ist.

Das Multi-PDZ Domänen Protein 1 (engl.: *Multi-PDZ domain protein*; MUPP1) ist bei der Analyse der C-terminalen Interaktionspartner des Serotoninrezeptors 5-HT_{2C} im menschlichen Gehirn entdeckt worden und besteht aus hoch konservierten Sequenzen für 13 PDZ-Domänen (*post-synaptic density 95*, *Drosophila discs larger*, *zona-occludens 1*), die als Proteininteraktionsdomänen fungieren (Ullmer et al., 1998). Aufgrund der zahlreichen Bindedomänen, aber der fehlenden katalytischen Einheit wird für das MUPP1 eine Funktion als Multiproteinadapter diskutiert, durch den beispielsweise in der olfaktorischen Signalkaskade beteiligte Proteine gebunden und in räumliche Nähe zueinander gebracht werden können (Carlson, 2000; Ullmer et al., 1998). Spätere Untersuchungen, die eine Lokalisation von MUPP1 in olfaktorischen Sinneszellen (Dooley et al., 2009) und eine Coexpression mit geruchsspezifischen Proteinen (ORs, ACIII) (Baumgart et al., 2014; Dooley et al., 2009) belegten, sowie eine funktionelle Beteiligung des sogenannten Gerüstproteins an der Odorant Detektion nachwiesen, indem in MUPP1-reduzierten Zellen eine OR-aktivierte verlangsamte Ca²⁺-Antwort beobachtet werden konnte (Dooley et al., 2009), unterstützten die Hypothese der MUPP1-Partizipation an einer „Olfaktosome-Struktur“, ohne jedoch die exakte Funktionsweise zu ergründen. Zusätzlich zur Expression im Gehirn und olfaktorischen Sinneszellen konnte in unterschiedlichen Arbeiten die Lokalisation des MUPP1 auch in testikulärem Gewebe (Ackermann et al., 2008; Heydecke et al., 2006) und in Geschmacksknospen der Zunge (Liu et al., 2012b) gezeigt werden, so dass eine Proteininteraktions-Funktion über das olfaktorische System hinaus möglich erscheint (Liu et al., 2012b).

Ein weiteres Odorant-spezifisches Protein entdeckten Margolis et al. 1972 (Margolis, 1972) bei dem Versuch, spezifischen Zelltypen des Nervensystems eine genaue Funktion zuzuordnen. Dieses niedermolekulare und phylogenetisch konservierte Protein wurde im Gehirn ausschließlich im *bulbus olfactorius* nachgewiesen, konnte aber schließlich auch in olfaktorischen Sinnesneuronen des olfaktorischen Epithels gezeigt werden, so dass es fortan als Marker primärer olfaktorischer Sinneszellen galt und deswegen als olfaktorisches Markerprotein (OMP) bezeichnet wird (Buiakova et al., 1996; Farbman and Margolis, 1980; Keller and Margolis, 1975; Monti-Graziadei et al., 1977). Eine Reduzierung neuronaler Aktivität von olfaktorischen Nervenfortsätzen um 20-40 % (Buiakova et al., 1996) und eine verlängerte olfaktorisch ausgelöste Zellantwort in OMP-defizienten Mäusen durch eine langsamere Rückbildung der Ca²⁺-Ströme (Kwon et al., 2009; Reisert et al., 2007) belegen die funktionelle Beteiligung des OMPs an der Odorant-vermittelten Signaltransduktion. Allerdings kann aufgrund noch unklarer funktioneller Strukturanalysen (Baldiiseri et al., 2002) für das OMP eine Rolle als Modulator

olfaktorischer Signale durch Proteininteraktionen bisher nur angenommen werden (Behrens et al., 2003; Ivic et al., 2000; Smith et al., 2002; Youngentob et al., 2003; Youngentob et al., 2004). Initiale Ergebnisse elektrophysiologischer Untersuchungen deuten auf einen Einfluss des OMPs auf die ACIII oder ein in der olfaktorischen Signalkaskade vorangeschaltetes Protein hin (Reisert et al., 2007). Neuere Studien unterstützen diese Hypothese, da sie einen Anstieg der ACIII-Proteinexpression in OMP-defizienten Neuronen belegen können (Lee et al., 2011). Zusätzlich ist in diesen chemosensorischen Sinnesneuronen eine verringerte ACIII-Phosphorylierung festgestellt worden, die die verlängerte Reizantwort in OMP-defizienten Mäusen und die daraus resultierende Desensibilisierung der Zelle erklären könnte (Kwon et al., 2009; Lee et al., 2011; Reisert et al., 2007). Unabhängig von seiner Funktion wurden in den letzten Jahren immer mehr Hinweise darauf gefunden, dass das OMP, gemeinsam mit weiteren olfaktorischen Signalproteinen, auch in nicht primär Odorant-assoziierten Gewebestrukturen exprimiert wird (Feldmesser et al., 2006; Flegel et al., 2013; Kang et al., 2015), so dass zusätzlich zur Funktion im olfaktorischen System auch eine grundlegendere Rolle in der chemosensorischen Wahrnehmung möglich erscheint (Kang et al., 2015).

Sowohl für das MUPP1 als auch das OMP, die beide an Proteininteraktionen beteiligt zu sein scheinen, konnten Colokalisationen mit olfaktorischen Signalproteinen im Geruchssystem, aber auch in weiteren „nicht-chemosensorischen“ Geweben gezeigt werden (Kang et al., 2015). Dies führt zu der Hypothese, dass beide Proteine als allgemeine Multiproteinadaptoren fungieren könnten und dadurch zu einem funktionierenden Ablauf einer Signalkaskade beitragen könnten. Um diese Hypothese weiter zu stützen, wurden in diesem Teil der vorliegenden Arbeit mRNA-basierte und immunhistochemische Nachweisreaktionen angewendet, um weitere Expressionsorte der Proteine zu entdecken und mögliche Colokalisationen mit weiteren chemosensorischen Signalproteinen zu zeigen.

4.3.1 Coexpression von MUPP1 und gustatorischen Signalmolekülen

Liu et al. zeigten erstmals, dass MUPP1 in einem weiteren chemosensorischen System, dem Geschmackssinn, exprimiert wird und teilweise colokalisiert mit der G-Protein-Untereinheit $G_{\gamma 13}$ erscheint (Liu et al., 2012b). Darüber hinaus konnte die Expression von MUPP1 auch im männlichen Reproduktionsgewebe gezeigt werden, einem nicht-chemosensorischen System, für das bereits Nachweise gustatorischer (Fehr et al., 2007; Li, 2013; Li and Zhou, 2012; Meyer et al., 2012; Mosinger et al., 2013; Voigt et al., 2012) und olfaktorischer (Fukuda et al., 2004; Spehr et al., 2003; Spehr et al., 2006) Signalproteine erbracht wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deswegen geprüft, ob MUPP1 in Geschmackszellen der Wallpapille mit Komponenten der gustatorischen Signalkaskade, die zusätzlich im männlichen Reproduktionsgewebe exprimiert werden, colokalisiert erscheint, so dass eine grundlegende Proteininteraktionsfunktion für das MUPP1 vermutet werden könnte.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden coronale Gefrierschnitte der Wallpapille folgender Reportermauslinien verwendet: Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP} und TRPM5- τ GFP. In Mäusen der Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Linie ist die codierende Sequenz für den Bitterrezeptor Tas2r131 deletiert und durch die Aminosäureabfolge einer Fluoreszenz-Kassette des hrGFPs ersetzt, die unter der Tas2r131-Promotorkontrolle exprimiert wird (Voigt et al., 2012). Mit Hilfe dieser *knockin*-Strategie ist es möglich, ohne Verwendung eines Antikörpers die Lokalisation des entfernten Tas2r131-Bitterrezeptors anhand der Expression des fluoreszierenden Reporterproteins zu erkennen. Bei der weiteren verwendeten TRPM5- τ GFP-Mauslinie ist die für den TRPM5-

codierende Region um die für das τ GFP-codierende Sequenz erweitert, so dass die Expression des TRPM5 immer mit einer GFP-Expression einhergeht (Kusumakshi et al., 2015). Nach der Anfertigung coronaler Gefrierschnitte der Wallpapille beider transgenen Mauslinien und nach einer Sättigung unspezifischer Bindungsstellen mit BSA wurden die Gewebepreparate mit einem anti-MUPP1 Antikörper aus dem Kaninchen inkubiert, der gegen die PDZ-Domänen 5 und 6 gerichtet war (Ackermann et al., 2008). Die Bindung des Primärantikörpers wurde anschließend mit einem Alexa 546 konjugierten Anti-Kaninchen Sekundärantikörper aus dem Esel (rot) visualisiert (Abbildung 39 B und E), wobei die Auswertung etwaiger Fluoreszenzsignale mikroskopisch erfolgte.

In den Geschmacksknospen der Wallpapille (gestrichelte Linie) wurden einzelne Tas2r131-hrGFP- (Abbildung 39 A) bzw. TRPM5- τ GFP-positive (Abbildung 39 D) Geschmackszellen erkannt. Eine beobachtende quantitative Analyse zeigte, dass die Anzahl Tas2r131-hrGFP exprimierender Zellen erwartungsgemäß geringer ist als die Anzahl der TRPM5-positiven Zellen. Dies deckte sich mit Untersuchungen anderer Arbeiten, in denen beschrieben wurde, dass der TRPM5-Ionenkanal an diversen Geschmackspereptionen beteiligt ist (Damak et al., 2006; Zhang et al., 2003) und der Tas2r131 einer von vielen Bitterrezeptoren in den Geschmackszellen ist (Voigt et al., 2012). Die beobachtete zahlenmäßige Überlegenheit der TRPM5-exprimierenden Geschmackszellen stimmte daher mit den bisherigen Beobachtungen überein. Die Betrachtung der die MUPP1-Expression visualisierenden roten Fluoreszenzsignale zeigt deutlich, dass MUPP1 immer in TRPM5-positiven und Tas2r131-positiven Zellen exprimiert wird (Abbildung 39 C und F). Diese Colokalisation beider Proteine wird anhand der Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenzkanäle deutlich, die eine teilweise völlig deckungsgleiche Markierung in Gelb zeigt (Abbildung 39 C und F, Stern). Aufgrund der geringeren Anzahl an Tas2r131-Zellen in einer Geschmacksknospe konnten in Tas2r131-defizienten Wallpapillen darüber hinaus noch MUPP1-positive Zellen registriert werden, die kein hrGFP-Signal exprimierten (Abbildung 39 C Pfeil), wohingegen alle TRPM5-positiven Zellen auch eine MUPP1-Expression zeigten.

Diese Beobachtungen bestätigen die Befunde von Liu et al. (Liu et al., 2012b) und zeigen, dass MUPP1 nicht nur in olfaktorischen Neuronen, sondern auch in gustatorischen Sinneszellen exprimiert wird und dort colokalisiert mit dem TRPM5-Ionenkanal und dem Bitterrezeptor Tas2r131 vorliegt.

Der Nachweis von Proteinen, die an der chemosensorischen Wahrnehmung beteiligt sind, beschränkt sich nicht nur auf die primären Sinnesorgane (Nase und Mund), sondern ist am Beispiel des TRPM5 auch auf den Gastrointestinaltrakt (Bezencon et al., 2008; Kokrashvili et al., 2009b; Kusumakshi et al., 2015; Mitrovic et al., 2013; Perez et al., 2002), das respiratorische System (Kaske et al., 2007; Lin et al., 2008; Tizzano et al., 2011) und das männliche Reproduktionsgewebe (Li, 2013; Li and Zhou, 2012) ausgeweitet. Um zu überprüfen, ob MUPP1 auch außerhalb der initialen chemosensorischen Systeme in TRPM5-positiven Zellen nachzuweisen ist, wurden coronale Gefrierschnitte des Magens einer TRPM5- τ GFP Maus, in der das grün-fluoreszierende Fusionsprotein TRPM5- τ GFP exprimiert wird, angefertigt und mit einem anti-MUPP1 Antikörper aus dem Kaninchen inkubiert und anschließend die Antikörperbindung durch einen rot-fluoreszierenden Alexa 546 konjugierten anti-Kaninchen Sekundärantikörper aus dem Esel visualisiert.

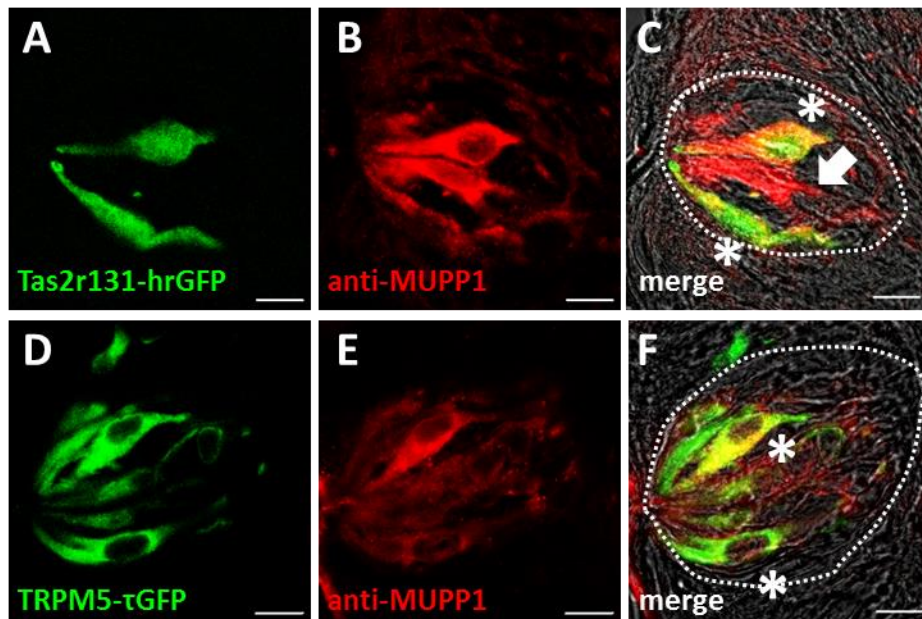


Abbildung 39: Immunologischer MUPP1-Nachweis in murinen Zungengewebe. Wallpapillen-Gefrierschnitte (6-8 µm) zweier Mauslinien (Tas2r131-hrGFP, TRPM5-τGFP) wurden mit einem anti-MUPP1 Antikörper aus dem Kaninchen, der die PDZ-Domänen 5 und 6 erkennt, inkubiert und die Antikörper-Antigen-Interaktionen mit einem rot-fluoreszierenden Alexa 546-konjugierten anti-Kaninchen Antikörper sichtbar gemacht. In der Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Mauslinie ist der Bitterrezeptor Tas2r131 genetisch deletiert und durch die codierende Sequenz einer hrGFP-Fluoreszenzkassette ersetzt worden, so dass die Expression des Fluoreszenzproteins unter der Kontrolle des Tas2r131-Promotors steht. Die TRPM5-τGFP-Mauslinie exprimiert unter der Promotorkontrolle des *Trpm5*-Gens ein Fusionsprotein aus TRPM5 und dem Fluoreszenzprotein τGFP. **[A-C]** zeigt eine mikroskopische Vergrößerung einer einzelnen Geschmacksknospe (gestrichelte Linie) mit Geschmackszellen. Dabei ist erkennbar dass alle Tas2r131-positiven Zellen **[A]** auch MUPP1 exprimieren **[B]**, aber auch einzelne Zellen auszumachen sind, die zwar eine MUPP1-Markierung zeigen, aber kein hrGFP-Signal **[C, Pfeil]**. Anders verhält es sich für die TRPM5-positiven Zellen in der Geschmacksknospe **[D-F]**: hier zeigen alle τGFP-positiven Zellen **[D]** auch positive Immunsignale für MUPP1 **[E]**. In der überlagerten Darstellung beider Farbkanäle ist die Colokalisation des Bitterrezeptors und des MUPP1 **[C, Stern]** aber auch des TRPM5 und des MUPP1 **[F, Stern]** durch eine gelbe Markierung zu erkennen. Gezeigt sind einzelne Fluoreszenzkanalaufnahmen und überlagerte Bilder des grünen und roten Farbkanals sowie einer Durchlichtaufnahme. Maßstab: 10 µm.

Bei der mikroskopischen Auswertung der Gefrierschnitte wurden drei unterschiedliche Bereiche des murinen Magens untersucht: Corpus, „*limiting ridge*“ und Pylorus (Abbildung 40). Der Corpus ist der größte Teil des Magens, in dem die enzymatische Verdauung des Magenbreis stattfindet und an die die ausschließlich in Nagern vorkommende „*limiting ridge*“ angrenzt, eine faltenartige Struktur in der Nähe des Mageneingangs, die außerdem eine Trennung zwischen Fundus und Corpus darstellt (Luciano and Reale, 1992). Der Pylorus hingegen ist am Übergang des Magens in den Zwölffingerdarm (Duodenum) gelegen und reguliert das Weiterleiten des Mageninhalts in den intestinalen Bereich des Verdauungstrakts. Analysen histologisch markierter MUPP1-Präparate eines TRPM5-τGFP Magens zeigen, dass in allen drei untersuchten gastrointestinalen Abschnitten vereinzelt chemosensorische TRPM5-positive Zellen zu detektieren sind (Abbildung 40 A, D, G). Anders als im Corpus-Bereich, in dem nur eine unspezifische, schleierartige Markierung durch den anti-MUPP1 Antikörper erfolgte (Abbildung 40 B), konnten in TRPM5-positiven Zellen der „*limiting ridge*“ und des Pylorusareal auch einzelne MUPP1-Fluoreszenzsignale festgestellt werden (Abbildung 40 E, H). Publikationen der letzten Jahre zufolge handelt es sich bei den TRPM5- und hier auch MUPP1-positiven Zellen der „*limiting ridge*“ um Mikrovilli-tragende Bürstenzellen (sogenannte „*brush cells*“) (Bezencon et al., 2008;

Eberle et al., 2013; Kusumakshi et al., 2015), die jedoch auch vereinzelt im Pylorusbereich vorkommen (Akimori et al., 2011), so dass auch hier eine Expression der beiden Proteine in den „brush cells“ möglich erscheint. Um diese Hypothese zu stützen, könnten Studien unter Zuhilfenahme des Bürstenzellmarkers Zytokeratin (Hofer and Drenckhahn, 1996) durchgeführt werden.

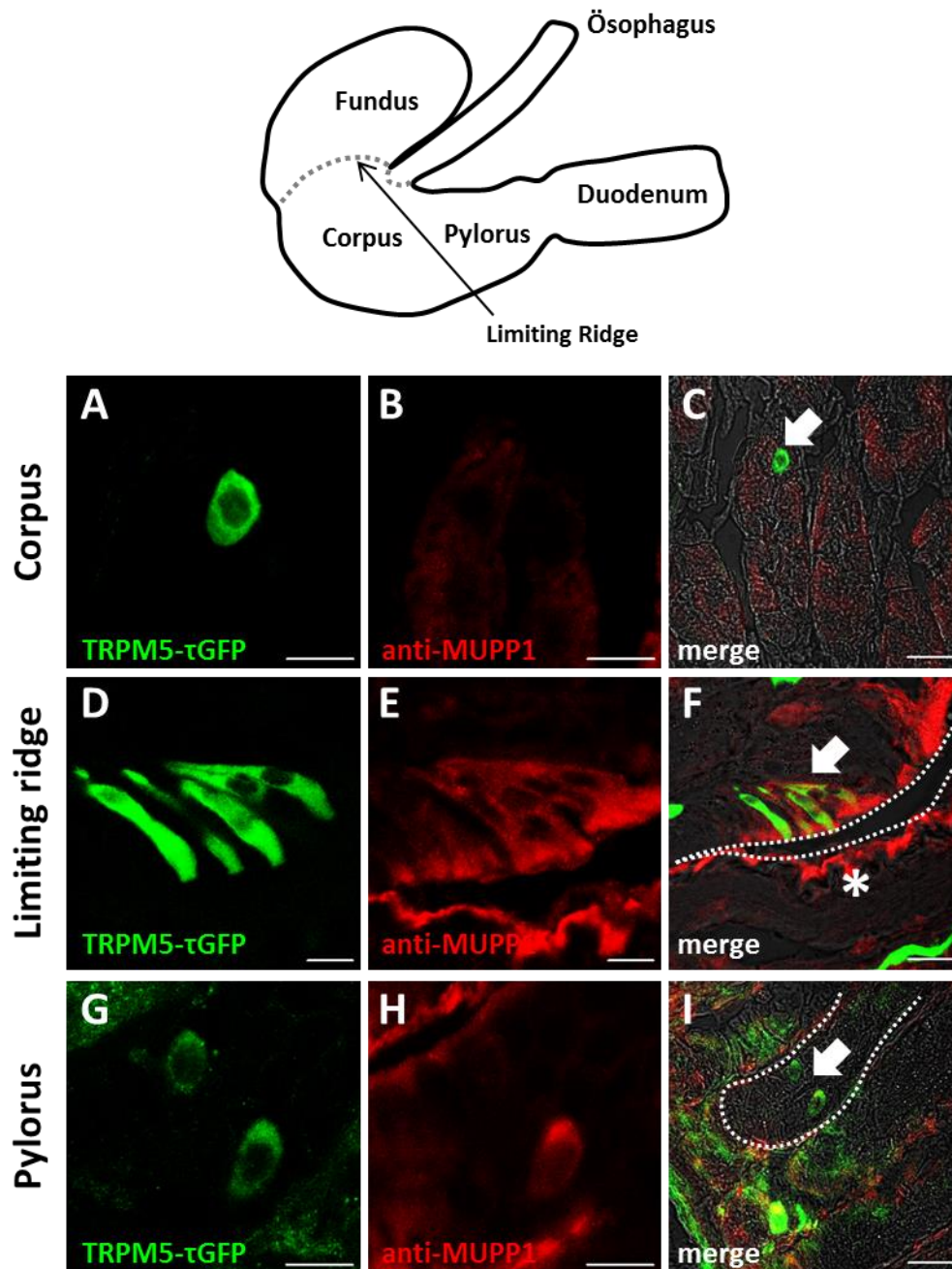


Abbildung 40: Expression und Colokalisation von MUPP1 und TRPM5 im Nagermagen. Die schematische Skizze zeigt den Magen einer Maus, der in die Bereiche Fundus, Corpus und Pylorus gegliedert ist. Fundus und Corpus werden durch die Struktur der „limiting ridge“ voneinander getrennt. Der Übergang vom Magen in den Intestinaltrakt, beginnend mit dem Duodenum, wird als Pylorus bezeichnet. In den Bereichen Corpus, „limiting ridge“ und Pylorus wurden bereits chemosensorische Aktivitäten festgestellt.

Gefrierschnitte (14 μ m) des Magens einer TRPM5- τ GFP Maus wurden mit einem anti-MUPP1 Antikörper behandelt und anschließend die immunologische Bindung mit einem rot-fluoreszierenden Alexa 546 konjugierten anti-Kaninchen Antikörper sichtbar gemacht. Die drei Magen-spezifischen Bereiche wurden mikroskopisch auf eine MUPP1-

Expression und eine mögliche Colokalisation von MUPP1 und TRPM5 untersucht. Ein Ausschnitt aus der Corpus-Region zeigt eine vereinzelte TRPM5- τ GFP Zelle **[A]**, jedoch nur eine unspezifische Markierung durch den anti-MUPP1 Antikörper **[B]**. In der „*limiting ridge*“-Struktur **[F, gestrichelte Linie]** sind elongierte TRPM5- τ GFP-Zellen **[D]** zu erkennen und MUPP1-Fluoreszenzsignale **[E]**, die in der Überlagerung beider Farbkanäle mit dem τ GFP-Signal colokalisiert erscheinen **[F, Pfeil]**. Die rote, stark fluoreszierende Markierung des in das Magenlumen ragenden Epithels ist aufgrund der ausgeprägten Bindung des Antikörpers an die keratinisierte Struktur als falsch-positiv zu bewerten **[F, Stern]**. **[G-I]** zeigen einen Ausschnitt aus dem Pylorus mit basalen Bereichen von Pylorusdrüsen **[I, gestrichelte Linie]**. Neben unspezifischen, grünen Signalen sind spezifische TRPM5- τ GFP-Fluoreszenzsignale in zwei einzelnen, runden Zellen zu erkennen **[G]**, in denen auch ein anti-MUPP1 Signal zu detektieren ist **[H]**. Gezeigt sind Aufnahmen des roten- und grünen Fluoreszenzkanals sowie Überlagerungen mit einer Durchlichtaufnahme. Maßstab: 10 μ m.

4.3.2 OMP-Expression in murinen Lungengewebe

Neben dem Magen, für den bereits eine chemosensorische Aktivität beschrieben wurde (Behrens and Meyerhof, 2010; Rozengurt and Sternini, 2007; Sternini et al., 2008), ist auch die Lunge eines der wenigen inneren Organe, die direkt mit der Umwelt über eingeatmete Luft in Kontakt kommt und in der auch eine Signalkaskade mit gustatorischen und olfaktorischen Proteinen ausgelöst zu werden scheint (Gu et al., 2014; Kang et al., 2015; Kang and Koo, 2012; Kinnamon, 2012; Kinnamon and Reynolds, 2009; Tizzano et al., 2011; Tizzano et al., 2010). Es wird vermutet, dass chemosensorische Proteine unter anderem aus diesem Grund in der Lunge exprimiert werden: Um kleinste, eingeatmete Substanzen oder gefährliche Erreger zu erkennen und den Körper dann durch entsprechende Reaktionen zu schützen (Kinnamon and Reynolds, 2009). Aufgrund der bereits publizierten Befunde der ektopischen OMP-Expression (Kang et al., 2015) und der Hypothese, dass OMP durch Proteininteraktionen an der raschen Signalweiterleitung über chemosensorische Proteine beteiligt ist (Behrens et al., 2003; Ivic et al., 2000; Smith et al., 2002; Youngentob et al., 2003; Youngentob et al., 2004), wurde im Folgenden geprüft, wo exakt OMP in der Lunge exprimiert wird, und ob es colokalisiert mit weiteren chemosensorischen Proteinen vorzufinden ist. Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden RT-PCR Analysen, SDS-PAGE Untersuchungen und immunhistochemische Studien angewandt.

Zunächst wurde mit einer RT-PCR geprüft, ob OMP-mRNA in Gesamt-mRNA der Lunge nachzuweisen ist. Für die Durchführung wurden 2 μ g isolierter Lungen-mRNA in cDNA umgeschrieben und diese für die PCR-Reaktion eingesetzt. In Abbildung 41 A ist eine beispielhafte Aufnahme eines Agarosegels zu sehen, in dem die Amplifikationsprodukte der Größe nach separiert und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht wurden. Als Positivkontrolle wurde cDNA des olfaktorischen Epithels (OE) eingesetzt, mit der ein Amplifikationsprodukt in der erwarteten Größe (682 bp) erzeugt werden konnte. In der eingesetzten cDNA der Lunge konnte ebenfalls ein PCR-Produkt der gleichen Größe mit Hilfe der OMP-Primer detektiert werden, wobei das Signal der Bande um ein Vielfaches schwächer erschien, als das des OE-Amplifikationsprodukts. In der Negativkontrolle wurde anstelle von cDNA H₂O eingesetzt. Diese Spur zeigte keine positive Reaktion auf die Belichtung mit UV-Licht, so dass ein falsch-positives Ergebnis durch eine Verunreinigung der Reagenzien und der Arbeitsmaterialien ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 41 A).

Um aus der pulmonalen Expression des Markers für olfaktorische Sinneszellen eine mögliche Funktion des Proteins dort ableiten zu können, sollte des Weiteren festgestellt werden, in welchen Zelltypen der Lunge das OMP nachzuweisen ist. Mit mRNA unterschiedlicher muriner Lungenzelltypen (pulmonale Epithelzellen, pulmonale Fibroblasten, pulmonale glatte Muskelzellen, Pneumozyten Typ II (AT II-Zellen)), die von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof.

Alexander Dietrich des Walther-Straub-Instituts isoliert, in cDNA umgeschrieben und freundlicherweise für die folgenden Versuchsansätze zur Verfügung gestellt wurden, wurden erneut RT-PCR Studien durchgeführt. Die Auswertung dieser molekularbiologischen Versuchsansätze zur Amplifikation von OMP haben gezeigt, dass in Endothelzellen der Lunge keine Amplifikation des OMP-Gens registriert werden konnte (Abbildung 41 B). In PCR-Reaktionsansätzen mit cDNA von AT II-Zellen, pulmonalen Fibroblasten und pulmonalen glatten Muskelzellen konnte jedoch ein Amplifikationsprodukt mit der erwarteten Größe von 682 bp detektiert werden, wobei die DNA-Bande in der Spur der AT II-Zellen stets am stärksten erschien. Als Negativkontrolle wurde für jeden Versuchsansatz ein PCR-Reaktionsgemisch angesetzt, dem H₂O anstelle von cDNA zugegeben wurde. Diese Spuren wiesen nie eine positive Reaktion auf, so dass eine Kontamination der Reagenzien und ein falsch-positives Ergebnis ausgeschlossen werden konnten.

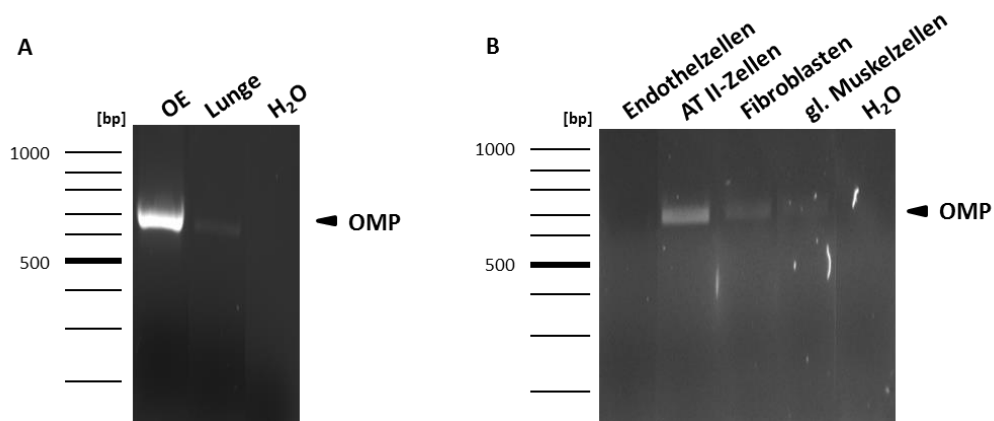


Abbildung 41: RT-PCR Analysen zur Expression von OMP in der murinen Lunge. Mit isolierter mRNA aus gefrorenem Gewebe wurde mit Oligo-dT Primern cDNA synthetisiert. Diese wurde anschließend gemeinsam mit murinen OMP-Primern in PCR-Reaktionsansätzen eingesetzt und anschließend mit einem Basenpaar-Marker auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Produkte wurden der Größe nach aufgetrennt und mit Hilfe eines DNA-bindenden Farbstoffs und UV-Licht sichtbar gemacht. **[A]** In dem OMP-positiven Gewebe des olfaktorischen Epithels [OE] konnte erfolgreich ein Amplifikationsprodukt des OMPs [682 bp] nachgewiesen werden. Eine weniger deutliche aber in der gleichen Größe befindliche Bande konnte auch anhand von cDNA der Lunge beobachtet werden. **[B]** Mit Hilfe von cDNAs unterschiedlicher Lungenzelltypen und OMP-spezifischen Primern wurde versucht die OMP-Genexpression auf einen pulmonalen Zelltyp einzugrenzen. Es konnte kein OMP-Amplifikationsprodukt in Endothelzellen festgestellt werden, jedoch waren Banden der PCR-Produkte mit der korrekten Größe von 682 bp in AT II-Zellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen zu detektieren, wobei das Signal des OMP-Amplifikationsprodukts in AT II-Zellen am stärksten erschien. In den Spuren der Negativkontrollen [H₂O], in die anstelle von cDNA Wasser eingesetzt wurde, sind keine Amplifikationen zu erkennen wodurch eine falsch-positive Bewertung der detektierten Banden ausgeschlossen werden kann.

Während der Proteinbiosynthese wird eine DNA-Geninformation in mRNA transkribiert und diese anschließend in ein funktionelles Protein translatiert (Campbell et al., 2006). Da der Nachweis einer mRNA nicht stets positiv mit einer Detektion des entsprechenden Proteins korreliert ist (Guo et al., 2008), wurde zur Überprüfung der OMP-Expression in der Lunge im Anschluss an die RT-PCR Analysen eine SDS-PAGE mit anschließender Western Blot Technik durchgeführt. Dazu wurden je 40 µg Protein eines Gewebelysats des olfaktorischen Epithels und der Lunge einer Ratte in einem SDS-Gel der Größe nach aufgetrennt. Nach Durchführung der Western Blot Methode wurde die Nitrozellulosemembran immunologisch mit einem anti-OMP

Antikörper aus der Ziege behandelt und durch einen HRP-gekoppelten anti-Ziege Antikörper das OMP-Proteinsignal nachgewiesen.

Während in Gelspuren, in denen das Gewebelysat des olfaktorischen Epithels (OE) aufgetragen wurde, immer eine etwa 19 kDa große Proteinbande detektiert werden konnte, die dem Molekulargewicht von OMP entspricht (Buiakova et al., 1996), blieb ein derartiger Nachweis für Lungenlysate stets aus (Abbildung 42). Ergebnisse der Arbeitsgruppe um JaeHyung Koo belegten bereits eine Proteinexpression des olfaktorischen Markerproteins in der Mauslunge durch eine Präzipitation des Proteins mit Hilfe eines anti-OMP Antikörpers (Kang et al., 2015). Da trotz dieser immunologischen Anreicherung auch diesem Forscherteam nur ein schwacher Nachweis des OMPs in der Lunge gelang, ist davon auszugehen, dass die hier angewendete Methode des Immunoblots nicht ausreichend sensitiv ist, um eine scheinbar minimale Proteinexpression des OMPs anhand von Gesamtgewebelysaten der Lunge nachzuweisen.

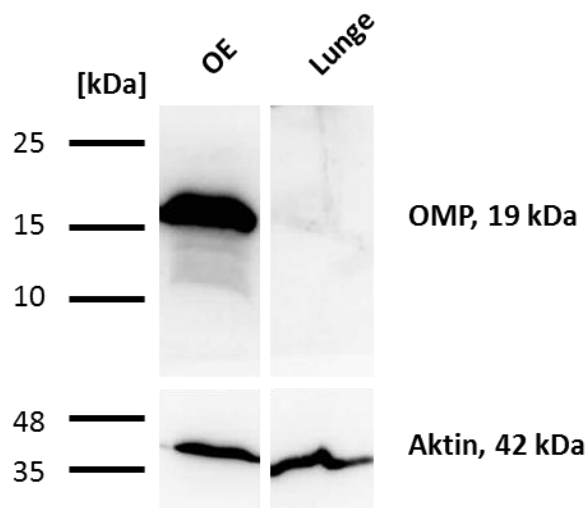


Abbildung 42: Proteinnachweis von OMP in der Lunge. 40 µg Protein von angefertigten Gewebelysaten aus gefrorenem Rattengewebe des olfaktorischen Epithels (OE) und der Lunge wurden neben einem Proteingrößenstandard auf ein SDS-Gel aufgetragen, der Größe nach aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Western Blot). Die Blotmembran wurde anschließend mit einem anti-OMP Antikörper aus der Ziege behandelt und die Antikörperreaktion über einen HRP-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen. Beispielhaft ist eine Aufnahme der Immunreaktion gezeigt. In der Spur des olfaktorischen Gewebelysats kann eine Bande auf der Höhe des zu erwartenden 19 kDa großen OMP-Proteins detektiert werden. In der Probe des Lungenlysats hingegen, kann keine derartige Bande erkannt werden. Um eine Beladung der Gelspuren mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen auszuschließen, wurde parallel eine Ladekontrolle mit einem anti-Aktin Antikörper durchgeführt. Im unteren Bereich der Abbildung ist anhand der gleich ausgeprägten Bandenintensität zu sehen, dass für das olfaktorische Epithel und das Lungengewebe ausreichend und in etwa gleich viel Protein aufgetragen wurde.

Die gegenüber dem olfaktorischen Epithel schwach ausgeprägte Amplifikationsstärke der OMP-mRNA in muriner cDNA der Lunge (Abbildung 41 A) und der ausbleibende OMP-Proteinnachweis in Lungengewebe der Ratte (Abbildung 42) deuten möglicherweise auf eine Expression des olfaktorischen Proteins in einzelnen Zelle der Lunge hin. Eine weitere Möglichkeit des Proteinnachweises stellt die Technik der Immunhistochemie dar, durch die mit Hilfe einer Antikörpernachweisreaktion eine Proteinexpression auf Einzelzellebene sowie die genaue Lokalisation des Proteins im Gewebeverband detektiert werden kann. Um das OMP direkt im Lungengewebe nachzuweisen, wurden Lungenparaffinschnitte von mindestens drei Mäusen angefertigt und immunologisch mit einem anti-OMP Antikörper aus der Ziege (1:100) behandelt und diese Immunreaktion mit einem Alexa 488 konjugierten anti-Ziege Antikörper aus dem Esel

visualisiert (Abbildung 43). Für die Überprüfung, ob der verwendete Antikörper OMP erkennen kann, wurden zu Beginn Gefrierschnitte des olfaktorischen Epithels einer Wildtyp-Maus mit diesem behandelt. Es konnte eine deutliche Markierung der olfaktorischen Sinneszellen (Abbildung 43 A, OSZ) in der Riechschleimhaut (Rs.), für die bereits eine OMP-Expression publiziert wurde (Buiakova et al., 1996), beobachtet werden. Versuche, ein OMP-Antikörpersignal in Gefrierschnitten der Mauslunge zu erzeugen, verliefen immer negativ, weswegen für den immunologischen Nachweis des OMPs in der Lunge Paraffinschnitte verwendet wurden, für deren Antikörper-Behandlung sich eine Antigen-Demaskierung mit Tris-EDTA, pH 9,0 am geeignetsten herausstellte. Mit diesem Verfahren war es möglich, mit einem anti-OMP Antikörper aus der Ziege und einem grün-fluoreszierenden Alexa 488 konjugierten anti-Ziege Antikörper vereinzelte Zellen im Alveolargewebe zu markieren (Abbildung 43 B und C, Pfeil). Hierbei fiel auf, dass die markierten Zellen ausschließlich im Lungenparenchym zu finden waren und dass diese eine unterschiedliche Morphologie zeigten. In mikroskopischen Analysen wurden zum einen OMP-positive Zellen entdeckt, die direkt an der Alveolaroberfläche lagen und eine kubische Erscheinung hatten (Abbildung 43 B, Pfeil). Zum anderen wurden in vereinzelt Fällen auch weitaus größere Zellen mit einem großen, runden, zentral gelegenen Nukleus, der durch den DNA-bindenden Farbstoff TO-PRO-3 blau dargestellt wurde (Abbildung 43 C, Pfeil), beobachtet. Diese Zellen wiesen zudem ein stark ausgeprägtes Zytoplasma auf, das Ausläufer zu benachbarten Zellen ausbildete.

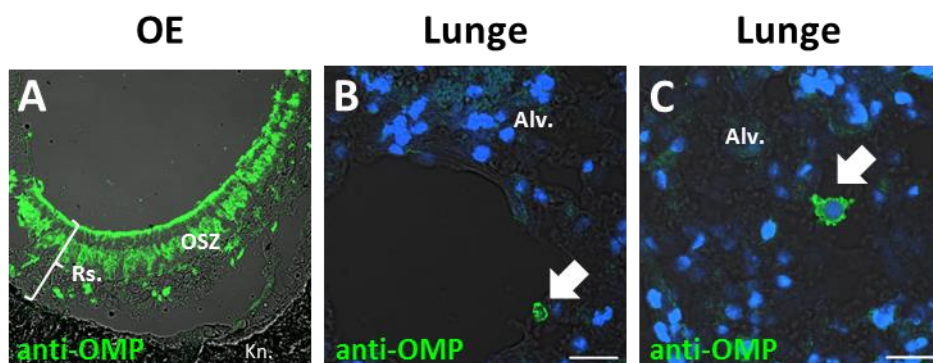


Abbildung 43: Immunhistologischer Nachweis der OMP-Expression in der Lunge. Gefrierschnitte des olfaktorischen Epithels und Paraffinschnitte der Lunge einer Wildtyp-Maus wurden mit einem anti-OMP Antikörper aus der Ziege und einem grün-fluoreszierenden Alexa 488 konjugierten anti-Ziege Antikörper aus dem Esel immunologisch markiert. Die blau dargestellten Zellkerne wurden in den Lungenschnitten mit dem Kernfarbstoff TO-PRO-3 gefärbt. Gezeigt sind Aufnahmen des olfaktorischen Epithels [A] und des Alveolargewebes [B+C]. In [A] ist ein Ausschnitt des olfaktorischen Epithels (Kn: Knorpel) gezeigt, der die grün erscheinende OMP-Expression in olfaktorischen Sinneszellen (OSZ) der Riechschleimhaut (Rs.) darstellt. [B] und [C] zeigen Vergrößerungen aus Bereichen des pulmonalen Parenchyms und einzelne grün-fluoreszierende Zellen [B+C, Pfeil]. Das Fluoreszenzsignal weist auf die Proteinexpression des OMP-Gens hin und zeigt, dass OMP-exprimierende Zellen direkt auf der Alveolaroberfläche liegen. In mikroskopischen Analysen konnten zwei verschiedene Zelltypen mit positiven OMP-Signal erkannt werden: kleine, kubische Zellen [B, Pfeil] und größere Zellen, mit zentralgelegenen, großen Zellkern und Ausläuferbildendem Zytoplasma [C, Pfeil]. Maßstab: 20 µm.

Nachdem mittels unterschiedlicher Methoden gezeigt wurde, dass OMP in der murinen Lunge exprimiert wird, war es als Nächstes interessant herauszufinden, ob Vertreter der olfaktorischen Signalkaskade ebenfalls in der Lunge vorzufinden sind, um eine mögliche Funktion des OMPs in den respiratorischen Zellen zu erkennen. Hierfür wurden RT-PCR Analysen an cDNA unterschiedlicher Lungenzelltypen durchgeführt und als Positivkontrolle erneut cDNA vom

murinen olfaktorischen Epithel verwendet. Die eingesetzten Primer wurden für das Erkennen von DNA-Abschnitten des ACIII- und G_{olf} -Gens konfiguriert und in der PCR eingesetzt. In den Gelspuren der amplifizierten cDNA-Proben konnten PCR-Produkte in den erwarteten Größen für ACIII (497 bp, Abbildung 44 A) und G_{olf} (484 bp, Abbildung 44 B) detektiert werden. Es war zu beobachten, dass die Signalstärke der ACIII-repräsentierenden Bande in der Spur mit cDNA des olfaktorischen Epithels deutlich intensiver erschien, als die des G_{olf} -Amplifikationsprodukts. Aufgrund der Beteiligung beider untersuchten Proteine an der olfaktorischen Signalkaskade (Hayden and Teeling, 2014) wurde eine vergleichbare mRNA Expression im olfaktorischen Gewebe erwartet, so dass das schwache G_{olf} mRNA-repräsentierende Signal auf unzureichende PCR-Bedingungen für die verwendeten G_{olf} -Primer hindeuten könnte. Mit Primern, die das ACIII-Gen erkennen, konnten mRNA-widerspiegelnde cDNA-Banden der korrekten molekularen Masse in allen getesteten Lungenzelltypen (pulmonale Endothelzellen, pulmonale Fibroblasten, pulmonale glatte Muskelzellen und AT II-Zellen) registriert werden (Abbildung 44 A), wohingegen keine mRNA des olfaktorischen G-Proteins in Form von Amplifikationsbanden in Lungenzellen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 44 B).

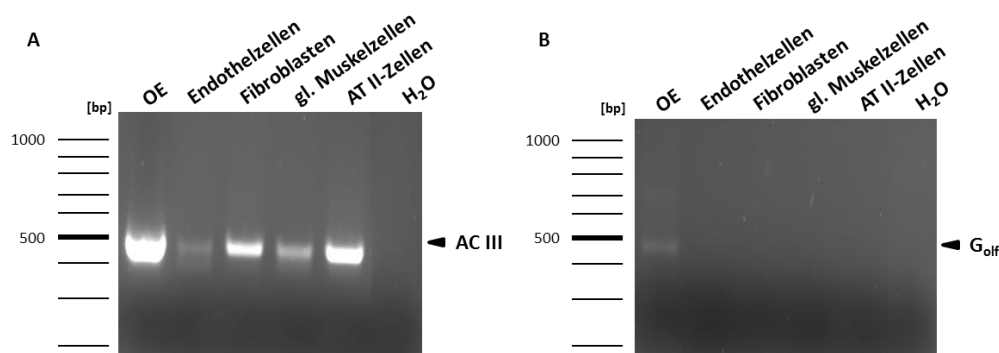


Abbildung 44: mRNA-Expression des ACIII- und G_{olf} -Gens in verschiedenen Lungenzelltypen. Mit Hilfe der RT-PCR Analyse und Primern für die ACIII und das G_{olf} wurde in cDNA-Proben unterschiedlicher Lungenzelltypen die Expression des ACIII- bzw. G_{olf} -Gens anhand von mRNA untersucht. Für die Positivkontrolle, in der eine Genexpression der olfaktorischen Proteine erwartet wird, wurde cDNA des olfaktorischen Epithels eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde stets ein Reaktionsansatz mitgeführt, der Wasser anstatt cDNA enthielt. Nach der Amplifikations-Reaktion wurden die Proben gemeinsam mit einem molekularen Größenstandard auf ein Agarosegel aufgetragen und größenabhängig aufgetrennt. In der Abbildung sind die Resultate auf die UV-Belichtung hin zu sehen. Sowohl für die Reaktionsansätze der Positivkontrolle mit ACIII-Primern [A], als auch mit G_{olf} -Primern [B] sind cDNA-Banden in den erwarteten Größen von 497 bp (ACIII) und 484 bp (G_{olf}) zu erkennen. Die Bande der G_{olf} -repräsentierenden mRNA im olfaktorischen Epithel ist im Vergleich zur ACIII-Bande wider Erwarten schwach. Für alle weiteren PCR-Ansätze mit ACIII-Primern und den cDNAs der unterschiedlichen Lungenzelltypen können ebenfalls 497 bp cDNA-Banden gezeigt werden [A]. Unter ihnen erscheint die Bande der AT II-Zellen am stärksten. Für die gleichen Reaktionsansätze jedoch mit G_{olf} -Primern konnte keinerlei positives Bandenmuster beobachtet werden, das auf eine G_{olf} -Expression in der Lunge hindeuten würde [B]. Die Negativkontrollen [H₂O] für diese Versuchsansätze zeigten keine positiven Signale in den entsprechenden Gelspuren.

Auch auf histologischer Ebene wurde versucht, die ACIII und das G-Protein G_{olf} in der Lunge zu visualisieren. Hierfür wurden erneut Paraffinschnitte der murinen Lunge mit Antikörper entweder gegen die ACIII oder das G_{olf} inkubiert. Gleichzeitig wurde mit einem OMP-Antikörper geprüft, ob eine mögliche Expression der olfaktorischen Signaltransduktionskomponenten mit der OMP-Expression colokalisiert ist. Im Alveolargewebe konnten mit dem anti-OMP Antikörper

aus der Ziege OMP-positive Zellen, die durch den fluoreszierenden Alexa 488 konjugierten anti-Ziege Antikörper aus dem Esel grün erschienen, nachgewiesen werden (Abbildung 45 A und E). Für einige der OMP-exprimierenden Zellen konnte zudem eine Expression der ACIII, die mit Hilfe eines anti-ACIII Antikörpers aus dem Kaninchen und einem Alexa 546 konjugierten anti-Kaninchen Antikörper aus dem Esel rot-fluoreszierend visualisiert wurde (Abbildung 45 B) gezeigt werden. Mit einem anti- G_{olf} Antikörper aus dem Kaninchen und dem bereits für den Nachweis der ACIII verwendeten rot-fluoreszierenden Zweitantikörper konnte unabhängig vom OMP-Signal kein mikroskopischer Nachweis für das olfaktorische G-Protein erbracht werden (Abbildung 45 F). Durch die Überlagerung des grünen und roten Fluoreszenzkanals wurde deutlich, dass zwar für das OMP- und die ACIII colokalisierte Antikörpermarkierungen in Zellen des Alveolargewebes festgestellt werden konnten (Abbildung 45 C), dass eine derartige Beobachtung jedoch nicht für OMP- und G_{olf} -Signale gemacht werden konnte (Abbildung 45 F). Bereits zuvor wurde gezeigt, dass das OMP nur in Alveolargewebe beobachtet werden konnte (Abbildung 43). Diese Feststellung konnte ebenfalls für die Expression der ACIII getroffen werden, die zwar in einzelnen Fällen in der Nähe des respiratorischen Epithels eines Bronchiolus exprimiert wird (Abbildung 45 D, Pfeil), jedoch nie in Zellen des Epithels. Ein immunologisches Fluoreszenzsignal, welches auf die Expression des G_{olf} -Gens hindeutet, konnte ebenfalls nicht in Zellen des respiratorischen Epithels erkannt werden (Abbildung 45 H).

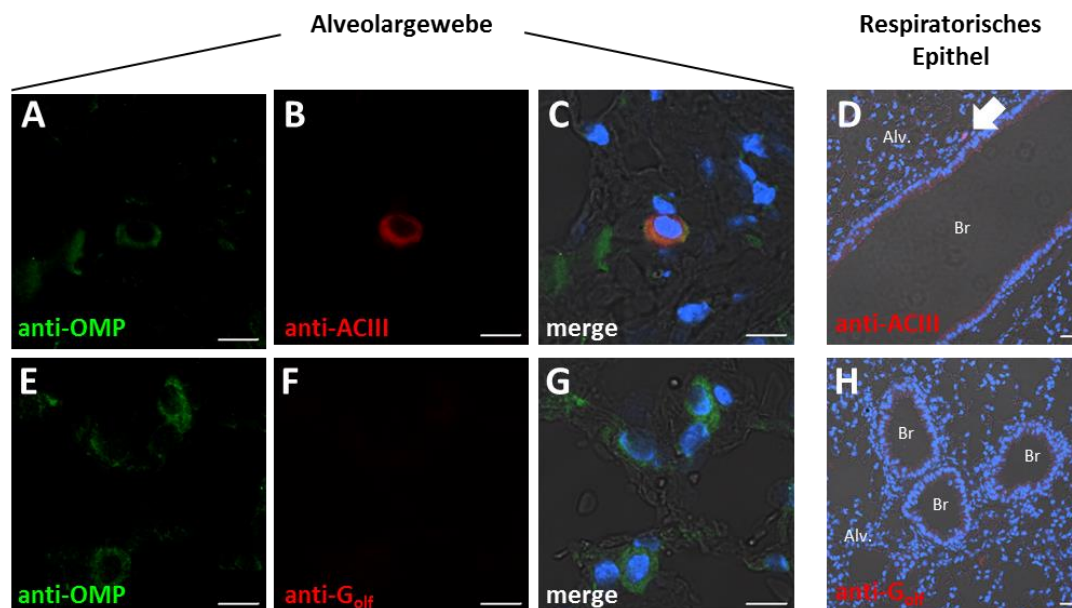


Abbildung 45: Coexpression von OMP und olfaktorischen Signalproteinen in Lungenzellen. Paraffinschnitte von Wildtyp-Mauslungen wurden entweder mit den Antikörpern anti-OMP (aus Ziege) und anti-ACIII (aus Kaninchen) oder mit anti-OMP und anti- G_{olf} (aus Kaninchen) comarkiert und die immunologische Bindung mit rot- (Alexa 546) bzw. grün (Alexa 488) fluoreszierenden Sekundärantikörpern gegen die gleiche Spezies in der der Primärantikörper generiert wurde, visualisiert. Die Zellkernstrukturen wurden mit dem Kernfarbstoff TO-PRO-3 angefärbt und blau dargestellt. Es sind Aufnahmen aus dem Alveolargewebe (links) und überlagerte Aufnahmen des respiratorischen Epithels (rechts) abgebildet. Zur besseren Darstellung sind für die Aufnahmen aus dem Alveolarbereich die grünen und roten Fluoreszenzkanäle einzeln [A+B, E+F] und in einer Überlagerung mit einer Durchlichtaufnahme gezeigt [C, G]. Im Alveolargewebe sind einzelne, grün-fluoreszierende OMP-positive Zellen zu sehen [A, E], die gleichzeitig eine ACIII-Expression durch ein rotes Fluoreszenzsignal präsentieren [B], jedoch keinen Hinweis auf eine G_{olf} -Expression geben [F]. [C+G] bilden die überlagerten Fluoreszenzsignale gemeinsam mit einer Durchlichtaufnahme ab und verdeutlichen die Comarkierung einer Alveolarzelle durch die anti-OMP und anti-ACIII Antikörper [C]. [D+H]

zeigen Aufnahmen des respiratorischen Epithels eines Bronchiolus und verdeutlichen, dass dort keines der beiden geprüften olfaktorischen Signalproteine exprimiert wird. Eine einzelne ACIII-positive Zelle ist in der Nähe des Epithels hervorgehoben [D, Pfeil]. In [G] kann erneut keine positive Reaktion infolge der anti-G_{olf} Antikörperbehandlung entdeckt werden. Br: Bronchiolus; Alv.: Alveolargewebe. Maßstab: 20 µm.

Anhand der bisher durchgeführten Studien zur Expression des OMPs im respiratorischen System der Lunge konnte festgestellt werden, dass das olfaktorische Markerprotein im Alveolargewebe lokalisiert ist (Abbildung 43). Der Nachweis von OMP konnte auf mRNA Ebene nicht auf einen pulmonalen Zelltyp beschränkt werden (Abbildung 44 B) und auch in der Immunhistologie waren zwei unterschiedliche Zelltypen des Alveolarbereichs durch den anti-OMP Antikörper markiert (Abbildung 43 B, C). Während in OMP-positiven Zellen des Alveolargewebes auch ACIII-Fluoreszenzsignale festgestellt werden konnten (Abbildung 45 C), war eine Markierung der murinen Lungenpräparate durch einen anti-Golf Antikörper weder in OMP-positiven Zellen, noch in weiteren Zellen festzustellen (Abbildung 45 G). Zellen des respiratorischen Epithels von Bronchiolen wurden durch keinen der verwendeten olfaktorischen Marker erkannt (Abbildung 45 D, H).

4.3.3 Analysen zur Expression des gustatorischen Signalproteins TRPM5 in der Lunge
Während für das MUPP1 zusätzlich zur Colokalisation mit olfaktorischen Signalproteinen im Riechepithel (Dooley et al., 2009) auch eine Expression in Tas2r131- und TRPM5-positiven Geschmackszellen (Abbildung 39) und in TRPM5-positiven Zellen des Magens (Abbildung 40) gezeigt wurde, konnte für das OMP ein Nachweis der Lokalisation in der Lunge und dort zur Colokalisation mit dem olfaktorischen Signaltransduktionsprotein ACIII erbracht werden. Ähnlich der in der vorliegenden Arbeit unterstützten Hypothese, dass MUPP1 als allgemeiner Multiproteinadapter fungieren könnte (Carlson, 2000; Ullmer et al., 1998), würde eine Colokalisation von OMP mit weiteren chemosensorischen Signalproteinen außerhalb der primären Geruchsorgane ebenfalls auf eine derartige Funktion hindeuten. Um die bereits publizierten Befunde der TRPM5-Expression in der Lunge (Kaske et al., 2007; Kusumakshi et al., 2015; Tizzano et al., 2011) zu bestätigen, wurden initial RT-PCR Analysen mit muriner Lungen-mRNA und immunhistologische Gewebemarkierungen der Lunge mittels eines anti-TRPM5 Antikörpers durchgeführt, um eine mögliche Colokalisation von OMP und TRPM5 in pulmonalen Zellen zu untersuchen.

Für die mRNA-basierte Expressionsanalyse des TRPM5 in der murinen Lunge wurden zunächst 2 µg isolierter mRNA in cDNA umgeschrieben und diese zusammen mit TRPM5-Primern (Prandi et al., 2013) in einzelnen PCR-Reaktionen amplifiziert. Als Positivkontrolle wurde cDNA von isolierten Maus-Wallpapillen (CV) verwendet. Um die Reinheit der Arbeitsmaterialien und PCR-Reagenzien und die Spezifität des mittels UV-Licht gewonnenen Signals zu prüfen, wurde in der Negativkontrolle keine cDNA, sondern H₂O eingesetzt. Mit cDNA der Wallpapille konnte der Nachweis der TRPM5-mRNA erbracht werden (Abbildung 46, CV), wohingegen die Negativkontrolle kein Amplifikationssignal (Abbildung 46, H₂O) zeigte und dadurch eine Verunreinigung ausgeschlossen werden konnte. In der Spur, in der das Amplifikationsprodukt der PCR mit Lungen-cDNA aufgetragen wurde, konnte wie in der Positivkontrolle, eine DNA-Bande in der Höhe des zu erwartenden Amplifikationsprodukts von 778 bp detektiert werden

(Abbildung 46, Lunge). Die Signalstärke der DNA-Bande in der Lungenprobe war allerdings deutlich schwächer als die entsprechende Bande in der Positivkontrolle der CV.

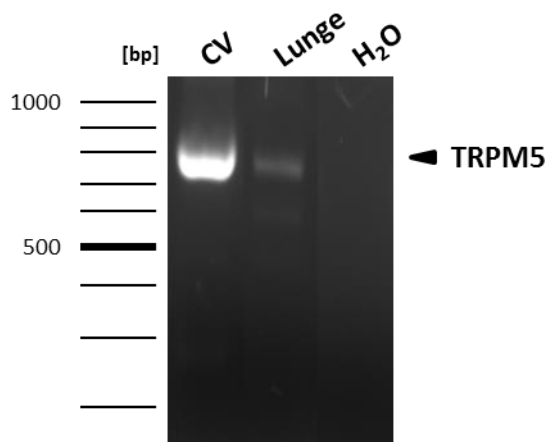


Abbildung 46: mRNA basierender Nachweis der TRPM5-Expression in der Lunge. Isolierte mRNA aus Wallpapillen (CV) und der Lunge von Wildtyp-Mäusen dienten als Ausgangsmaterial für die cDNA Synthese. Diese wurde neben TRPM5-Primern in einem Reaktionsgemisch für die RT-PCR eingesetzt. Nach der Reaktion wurden die Amplifikationslösungen neben einem Größenstandard auf ein Agarosegel aufgetragen und hinsichtlich ihrer Bandengröße untersucht. In der Spur der Positivkontrolle, für die cDNA der CV eingesetzt wurde, kann eine Bande in der Höhe der erwarteten Produktgröße (778 bp) gezeigt werden [CV]. Neben dieser ist auf gleicher Höhe eine schwächere Bande in der Spur der Lungen-Reaktionsprobe zu erkennen. Um die Spezifität der Bandensignale zu überprüfen wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, in deren Reaktionsansatz keine cDNA, sondern Wasser eingesetzt wurde. In der H₂O-Spur ist zu erkennen, dass kein unspezifisches Amplifikationsprodukt gebildet wurde und somit keine falsch-positiven Ergebnisse gezeigt sind.

Eine Variante der RT-PCR ist die *in situ* RT-PCR, mit der direkt in einem Gewebeschnitt mRNA mittels einer speziellen reversen Transkriptase und fluoreszenzgekoppelten Primern in cDNA umgeschrieben werden kann. Anschließend daran findet eine *in situ* PCR statt, deren Amplifikationsprodukte direkt im Gewebe über Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert werden können. Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, die Expression und gleichzeitig die Lokalisation des TRPM5 in der Lunge auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Die Lokalisation könnte Aufschluss über eine mögliche Funktion des Ionenkanals in der Lunge geben.

Die Durchführung dieses Versuchs an Paraffinschnitten einer humanen Lunge erfolgte einmalig an der Sporthochschule in Köln unter der Leitung von Herrn Prof. Bloch. Neben den als Positivkontrolle fungierenden Fluoreszenzprimern, die das β -Aktin Gen erkannten, wurden auch TRPM5- und OMP-Primer angewendet, um sowohl die Expression des TRPM5 und des OMPs in der Lunge durch eine weitere Technik zu verifizieren, als auch, um möglicherweise identisch markierte Bereiche zu erfassen. In Abbildung 47 sind Übersichtsaufnahmen des Lungengewebes mit grün-fluoreszierenden Signalpunkten, die den Ort der cDNA-Amplifikation widerspiegeln, gezeigt. Einzelne Zellen, für die eine positive Reaktion festgestellt wurde, sind vergrößert in einem Insert in der Abbildung gezeigt. Mit Hilfe der *in situ* PCR Technik war es möglich, TRPM5 (Abbildung 47 A, Pfeil), OMP (Abbildung 47 B, Pfeil) und β -Aktin (Abbildung 47 C, Pfeil) auf mRNA-Ebene in einzelnen Zellen des Alveolargewebes nachzuweisen. Zu erkennen war, dass nur in wenigen Zellen mit Hilfe der fluoreszierenden Primer die *Trpm5*-Expression identifiziert wurde. Dieser Befund unterstützte zum einen das Ergebnis der RT-PCR mit Lungen-mRNA und

TRPM5-Primern, in der im Vergleich zur DNA-Bande in der CV-Spur in der Lunge nur wenig TRPM5-Sequenzen amplifiziert werden konnten, wodurch die schwache Intensität der Bande erklärt werden kann (Abbildung 46). Zum anderen bestätigt dieses Ergebnis die bisher nur in vereinzelt Lungenzellen festgestellte TRPM5-Expression (Kaske et al., 2007; Kusumakshi et al., 2015; Tizzano et al., 2011). Zusätzlich zur Verifikation der TRPM5-Ergebnisse unterstützen die ebenso vereinzelt auftretenden pulmonalen OMP-Amplifikationssignale die schwache OMP-Amplifikationsbande in RT-PCR Analysen mit Lungen-mRNA und OMP-Primern (Abbildung 41) sowie die ausschließlich im Alveolargewebe erfassten immunologischen OMP-Signale (Abbildung 43).

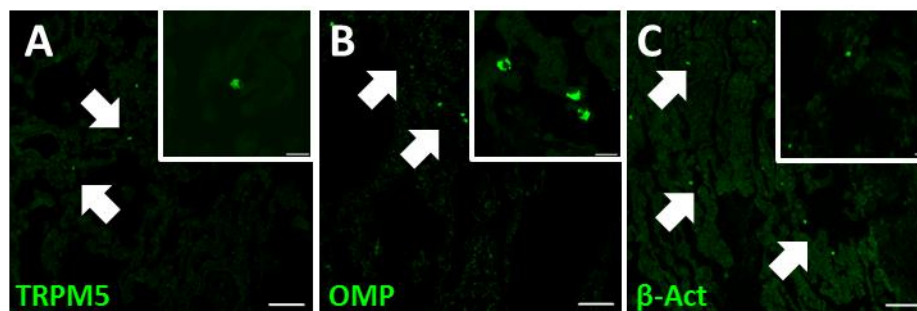


Abbildung 47: *In situ* RT-PCR an humanen Lungenschnitten mit Primern chemosensorischer Marker. Eine Kombination aus *in situ* Hybridisierung und RT-PCR konnte mit der Methode der *in situ* RT-PCR direkt an Paraffinschnitten von humanem Lungengewebe eingesetzt werden. In der ersten Reaktion wurde über Fluoreszenzgekoppelte Primer (grün) und einer spezifischen reversen Transkriptase mit Polymeraseaktivität zuerst die mRNA in cDNA umgeschrieben und anschließend in einer weiteren enzymatischen Reaktion diese als Matrize für die darauffolgende RT-PCR Reaktion verwendet. Mikroskopisch kann der Reaktionsablauf und die mRNA-Lokalisation mit Hilfe der grünen Fluoreszenzsignale detektiert werden. In **[A-C]** sind Übersichtsaufnahmen des humanen alveolaren Gewebes mit vereinzelt stark fluoreszierenden Zellsignalen abgebildet **[Pfeil]**. Die Fluoreszenzsignale in den Zellen zeigen die Lokalisation der mRNA-Expression des TRPM5- **[A]**, OMP- **[B]** und β -Aktin- **[C]** Gens. Für jedes Gen ist zusätzlich eine vergrößerte Aufnahme fluoreszierender Zellen als Insert in den Übersichtsaufnahmen gezeigt. Es ist zu erkennen, dass alle grün-fluoreszierenden Zellen im Alveolarbereich der Lunge zu detektieren sind und diese morphologisch ähnlich erscheinenden Zellen nur vereinzelt vorliegen. Lungengewebe verfügt über eine starke Autofluoreszenz, weswegen in jeder Aufnahme ein diffuses jedoch unspezifisches, grünes Signal zu erkennen ist. Maßstab: 50 μ m; Insert: 10 μ m.

Die Lokalisation der TRPM5-mRNA-Fluoreszenzsignale konnte auf den Bereich des Alveolargewebes eingegrenzt werden. Dieser Befund erscheint jedoch kontrovers zu den bisher veröffentlichten TRPM5-Expressionsdaten in der Lunge, da ausschließlich von TRPM5-Markierungen in Bronchiolen berichtet wird (Kaske et al., 2007; Kusumakshi et al., 2015; Tizzano et al., 2011). Um die exakte Lokalisation des gustatorischen Ionenkanals im Lungengewebe zu überprüfen, wurden immunologische Markierungen an Paraffinschnitten der Mauslunge mit einem anti-TRPM5 Antikörper durchgeführt. Dieser in Kaninchen hergestellte Antikörper erkennt das C-terminale Ende des Proteins und wurde von Herrn Dr. Chubanov (Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität München) generiert, der diesen freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat.

Mit Hilfe dieses anti-TRPM5 Antikörpers und eines rot-fluoreszierenden Alexa 546-konjugierten anti-Kaninchen Antikörpers konnten im respiratorischen Epithel von Bronchiolen (Abbildung 48 A, gestrichelte Linie) einzelne, isoliert liegende TRPM5-exprimierende Zellen identifiziert werden (Abbildung 48 A, Pfeil), wie es bereits in der angegebenen Literatur veröffentlicht wurde

(Kaske et al., 2007). Darüber hinaus wiesen jedoch auch vereinzelte ebenfalls inselartig auftretende Zellen des Alveolargewebes rot-fluoreszierende Signale auf, die auf eine TRPM5-Proteinexpression hindeuten (Abbildung 48 B, Pfeil) und dadurch auch das Ergebnis der *in situ* RT-PCR mit TRPM5-Primern (Abbildung 48 A) unterstützen. Da anhand der immunhistologischen Ergebnisse eine Expression des TRPM5 im Alveolarbereich der Lunge bestätigt werden konnte, wurde als Nächstes geprüft, ob der TRPM5 gemeinsam mit OMP, das bereits in Alveolarzellen gezeigt wurde (Abbildung 43), in den gleichen Zellen nachgewiesen werden kann. Hierfür wurden immunologische Comarkierungsstudien an murinen Lungenparaffinschnitten durchgeführt, die dafür mit dem anti-OMP Antikörper aus der Ziege und einem anti-TRPM5 Antikörper aus dem Kaninchen inkubiert wurden. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte anschließend durch die Behandlung mit einem grün-fluoreszierenden Alexa 488 konjugierten Anti-Ziege Antikörper aus dem Esel (anti-OMP) bzw. einem rot-fluoreszierenden Alexa 546 konjugierten Anti Kaninchen Antikörper aus dem Esel (anti-TRPM5). Die Analysen zeigen einzelne Zellen im Alveolarbereich, die beide Proteine exprimieren (Abbildung 48 C). Bei der Betrachtung der TRPM5-Markierung ist eine vereinzelt liegende Zelle im Alveolarbereich mit einem schwachen TRPM5-Fluoreszenzsignal zu beobachten (Abbildung 48 C, Insert). In der überlagerten Darstellung des grünen OMP- und roten TRPM5-Fluoreszenzsignals ist aufgrund der Doppelmarkierung eine deutliche Colokalisation beider Fluoreszenzsignale sichtbar, wodurch auf eine Coexpression beider Proteine geschlossen werden kann (Abbildung 48 C).

Die Versuchsergebnisse, die in diesem Abschnitt des Ergebnisteils beschrieben wurden, zeigen, dass sowohl das MUPP1 als auch das OMP in weiteren, noch nicht publizierten Geweben (Magen: MUPP1; Lunge: OMP) erstmals nachgewiesen werden konnten. Beide Proteine sind bisher durch eine funktionelle Beeinträchtigung der olfaktorischen Kognition aufgefallen, weswegen sowohl die Expression außerhalb der primären olfaktorischen Organe als auch die Colokalisation mit dem gustatorischen TRPM5 interessant erscheint. Die dargestellten Befunde deuten auf eine Funktion unabhängig vom olfaktorischen System hin und deuten an, dass sowohl das MUPP1 als auch das OMP gemeinsam mit dem TRPM5 an der chemosensorischen Wahrnehmung in weiteren Geweben beteiligt sein könnte.

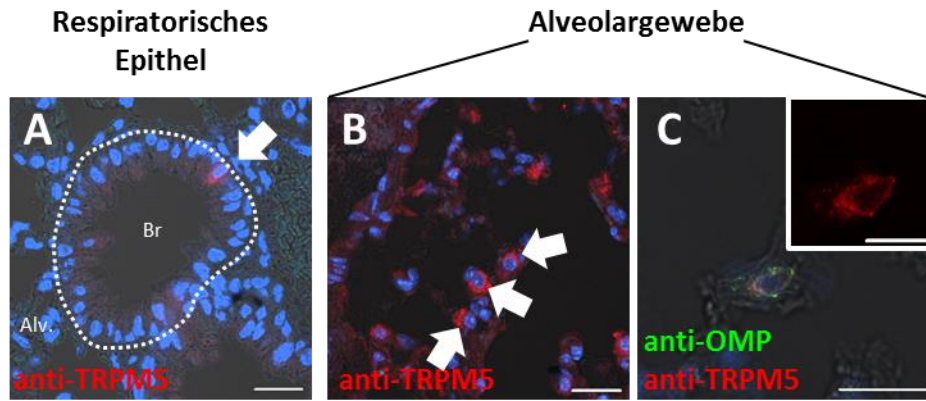


Abbildung 48: Immunhistochemischer Nachweis von TRPM5 in der murinen Lunge. Paraffinschnitte der Lunge von Wildtyp-Mäusen wurden mit einem anti-TRPM5 Antikörper und einem rot-fluoreszierenden Alexa 546 konjugierten anti-Kaninchen Antikörper aus dem Esel bzw. mit einem anti-OMP Antikörper aus der Ziege und einem grün-fluoreszierenden Alexa 488 konjugierten anti-Ziege Antikörper aus dem Esel inkubiert. Mikroskopisch wurden der alveolare Bereich und das respiratorische Epithel untersucht. **[A]** zeigt eine Aufnahme eines Bronchiolus mit dem dafür charakteristischen respiratorischen Epithel (gestrichelte Linie). In der dargestellten Epithelstruktur ist eine einzelne TRPM5-positive Zelle **[A, Pfeil]** zu erkennen, die in das Lumen des Bronchiolus hineinragt. Auch im Alveolargewebe können einzelne, immunologisch rot-markierte TRPM5-Zellen registriert werden **[B, Pfeil]**. Diese haben eine rundliche Morphologie und sind direkt an der Alveolaroberfläche situiert. Für die Fragestellung, ob OMP auch mit Proteinen aus anderen chemosensorischen Systemen interagieren könnte, wurde die Colokalisation des OMP-Signals mit einem TRPM5-Signal untersucht. In **[C]** ist eine Zelle im Alveolarbereich gezeigt, die sowohl den TRPM5 (Insert) als auch das OMP exprimiert. Zur Verdeutlichung des schwächeren TRPM5-Fluoreszenzsignals wurde dieses einzeln in einem Insert dargestellt. Maßstab: 20 µm.

5 Diskussion

5.1 Die Funktion gustatorischer Signalmoleküle im männlichen Reproduktionssystem

In den letzten Jahren werden immer häufiger wissenschaftliche Arbeiten veröffentlicht, die über die extraorale Expression chemosensorischer Signalproteine berichten. Die physiologische Funktion von Geschmacksrezeptoren, z. B. im Gastrointestinaltrakt, scheint dabei aber nicht etwa die Wahrnehmung von Geschmacksstoffen, sondern beispielsweise die Regulierung des neuroendokrinen beeinflussten Essverhaltens bzw. das Auslösen von Abwehrreaktionen in Folge toxischer Nahrungsaufnahme zu sein.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit konnte mit Hilfe der Reportermauslinien Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP} (Voigt et al., 2012) und TRPM5- τ GFP (Kusumakshi et al., 2015) die Expression des Bitterrezeptors Tas2r131 und des Ionenkanals TRPM5 in Hodengewebe der Maus bestätigt und deren fertilitätsbezogene Funktion detailliert untersucht werden. Die hier zusammengefassten Befunde bezüglich der reproduktiven Tas2r131-Funktion deuten auf einen hereditären Einfluss der homozygot defizienten Allelanlage des Bitterrezeptors hin (Abbildung 14). Zudem konnte am Beispiel der Tas2r131-Reportermauslinie der starke Einfluss genetischer Informationen des Donormausstamms in gentechnisch manipulierten Mauslinien mit nicht-kongenem Stammboden der Rezipientenmauslinie gezeigt werden. Anders als für die α -Gustducin-Tas1r3 Doppel-*knockout* Mauslinie, für die eine Sterilität der männlichen Mäuse gezeigt wurde (Mosinger et al., 2013), wurde in dieser Promotionsarbeit an den generierten Tas1r1-TRPM5- und Tas2r131-TRPM5-Doppel-*knockout*-Mauslinien zwar keine derart gravierende Einschränkung der Fertilität festgestellt (Tabelle 8), jedoch zeigen vor allem Tas1r1-TRPM5-defiziente Männchen eine Reihe von fertilitätsbezogenen Auffälligkeiten, die in dieser Ausprägung für Tas2r131-TRPM5-Doppel-*knockout*-Männchen nicht beobachtet wurden. Vor allem die stark reduzierte Anzahl an Spermien (Tabelle 9), die erhöhte Apoptoserate während der Spermatogenese (Abbildung 36) und die stark erniedrigte Wurfrequenz in kontinuierlichen Verpaarungsansätzen (Tabelle 8) machen dies deutlich.

5.1.1 Tas2r131-abhängige Fertilitätsanalysen

Die Deletion des im murinen Hoden äußerst stark exprimierten Bitterrezeptors Tas2r131 zeigt am Tiermodell der noch nicht-kongenem Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Mauslinie eine bisher nicht erklärbare, signifikant erhöhte Spermienanzahl in homozygot defizienten Männchen und eine signifikante Abweichung von den erwarteten Mendelschen Vererbungsgesetzen unter Nachkommen geschlechtsspezifischer Verpaarungen von heterozygoten Tas2r131-Tieren (Meyer, 2013). Mit Hilfe neu generierter Peptidantikörper sollte daher im Rahmen dieser Promotionsarbeit geprüft werden, ob in heterozygoten Tas2r131-Männchen die Population der haploiden Tas2r131-defizienten Spermien größer ist, als die eigentlich im gleichen Verhältnis zu erwartende Gruppe der Tas2r131 [+] -Keimzellen. Dadurch ließe sich die festgestellte Genotypverschiebung zugunsten heterozygoter Nachkommen von Tas2r131 [+/+] -Weibchen und Tas2r131 [+/-] -Männchen (Meyer, 2013) erklären.

In immunhistochemischen Versuchsansätzen mit Zungen-Gewebeschnitten der *papillae circumvallate* Geschmackspapille von Tas2r131 [+/+]-Mäusen zeigte sich mit den neu-generierten Tas2r131 Antikörpern gegen jeweils eine Tas2r131-spezifische Sequenz des N- bzw. C-Terminus tatsächlich eine Immunreaktivität in einzelnen Geschmackszellen (Abbildung 13). Allerdings war es durch den Einsatz der Tas2r131-Reportermäuse als Kontrollgewebe möglich zu zeigen, dass die Antikörper-Markierungen in wesentlich mehr Geschmackszellen auszumachen waren, als hrGFP-positive Zellen in Tas2r131-defizienten Zungengewebe registriert wurden (Abbildung 13). Zudem wurde mit allen generierten Tas2r131-Antikörpern auch eine Markierung in den GFP-positiven und daher Tas2r131-negativen Sinneszellen beobachtet (Abbildung 13). Aus diesen beiden Befunden zur Spezifitätsanalyse der neu generierten Tas2r131-Antikörper muss daher leider insgesamt geschlussfolgert werden, dass sowohl Antikörper gegen den N-Terminus als auch gegen die C-terminale Domäne möglicherweise den Tas2r131 zwar detektieren, aber zusätzlich noch weitere Vertreter der Bitterrezeptorfamilie oder auch andere in Geschmacksinneszellen vorkommende GPCRs, wie z. B. die ebenfalls zur Klasse A der GPCRs gehörenden ORs (Kang and Koo, 2012) erkennen könnten. Als mögliche Ursache für die beobachteten unspezifischen Tas2r131-Antikörperreaktionen wäre denkbar, dass beide verwendeten Peptide, trotz ihrer Spezifität für den Tas2r131, im endogenen nativen Rezeptor eine andere Faltung aufweisen als die synthetisch hergestellten Peptide, gegen die die Kaninchen entsprechende Antikörper produziert haben (Hutchings et al., 2010; Pradidarcheep et al., 2009). Es ist aber auch vorstellbar, dass die dreidimensionale Struktur der ausgewählten Peptide sich auch in anderen Klasse A GPCRs wiederfindet, was dann zur Markierung von mehr Geschmackszellen innerhalb einer Geschmacksknospe führen würde, als die GFP-Markierung in der Reportermäuse (Abbildung 13). Da die produzierten anti-Tas2r131 Antikörper aber auch in hier nicht vorgestellten Western Blot Analysen und damit unter denaturierenden Bedingungen, mit heterolog exprimierten Tas2r131 und Zungengewebe keine spezifische Markierung zeigten, ist insgesamt eher anzunehmen, dass die Immunogenität der Peptide nicht ausreichend war, um die Kaninchen zu einer entsprechend starken Produktion von anti-Tas2r131 Antikörpern anzuregen.

Dieser negative Befund bezüglich der Spezifität der generierten Tas2r131-Antikörper bedeutet gleichzeitig aber auch, dass die generierten Tas2r131-Antikörper aufgrund der möglichen zusätzlichen Erkennung anderer GPCRs nicht für die Beantwortung der Frage genutzt werden können, ob heterozygote Tas2r131-Männchen tatsächlich einen prozentual höheren Anteil an Tas2r131 [-]-Spermien besitzen als zu erwarten wäre. In weiterführenden Studien an der beginnend kongenen Tas2r131-Mauslinie haben die hier vorgestellten Ergebnisse allerdings gezeigt, dass die an denen noch nicht-kongeneten Mäusen erfassten, teilweise sehr auffälligen Reproduktionsparameter, nicht immer auch für Tiere der sechsten Rückkreuzungsgeneration zu registrieren waren. Die hier vorgestellten quantitativen Bestimmungen epididymaler Spermien von beginnend kongenen Männchen haben dazu z. B. gezeigt, dass Männchen mit einer Tas2r131-Defizienz und einem höheren genetischen C57BL/6N-Hintergrund (98,4 %; N6) bezüglich der Spermienanzahl nicht mehr auffällig waren (Tabelle 5). Diese phänotypische Variabilität in verschiedenen Generationen der genetischen Rückkreuzung ist vermutlich auf die Interaktion der Gene des Donorstamms mit denen des Rezipienten-Mausstamms zurückzuführen (Yoshiki and Moriwaki, 2006). Dadurch kann es zum einen zur Hochregulierung kompensatorischer Signalwege kommen; zum anderen kann das Gen von Interesse mit

sogenannten „*modifier genes*“ verbunden sein, die ebenfalls Einfluss auf den spezifischen Phänotyp haben können (Linder, 2006; Montagutelli, 2000). Durch das mehrmalige Zurückkreuzen der Tiere wird die flankierende DNA des Donorstamms um das manipulierte Gen sukzessive reduziert und durch die genetische Information des Rezipienten-Mausstamms ersetzt (Montagutelli, 2000). Auf diese Weise werden mögliche Auswirkungen der flankierenden DNA reduziert, und die Funktion des transferierten Gens nicht unspezifisch von anderen Genen beeinflusst (Linder, 2006; Silva, 1997). Um die Bedeutung eines einzelnen Gens für einen Organismus einordnen zu können, werden transgene Mäuse in zehn Generationen auf den Rezipienten-Mausstamm (hier: C57BL/6N) zurückgekreuzt, und so eine kongene Mauslinie erzeugt (Yoshiki and Moriwaki, 2006) (Abbildung 49). Ein Stammhintergrund von 98,4 % (entspricht N6) beschreibt eine beginnend kongene Mauslinie, die bereits als Grundlage für phänotypische Untersuchungen einer transgenen Mauslinie fungieren kann (Sundberg and Schofield, 2009).

Die an den Tas2r131-defizienten Männchen beobachtete Heterogenität des Genotyp-Phänotyp Verhältnisses zeigt, dass die Kenntnis über den Genotyp eines Tieres nicht ausreicht, um einen distinkten Phänotyp eines Mutationsträgers vorherzusagen, sondern dass die Berücksichtigung des genetischen Hintergrunds ebenfalls von großer Wichtigkeit ist. Gerade die in diesem Fall beobachtete drastische Veränderung eines Merkmals (hier: Tas2r131 Spermienanzahl) unter verschiedenen genetischen Hintergründen zeigt, dass die Veränderung des genetischen Hintergrunds zu einer variablen Expression des Phänotyps führen kann (Doetschman, 2009; Montagutelli, 2000).

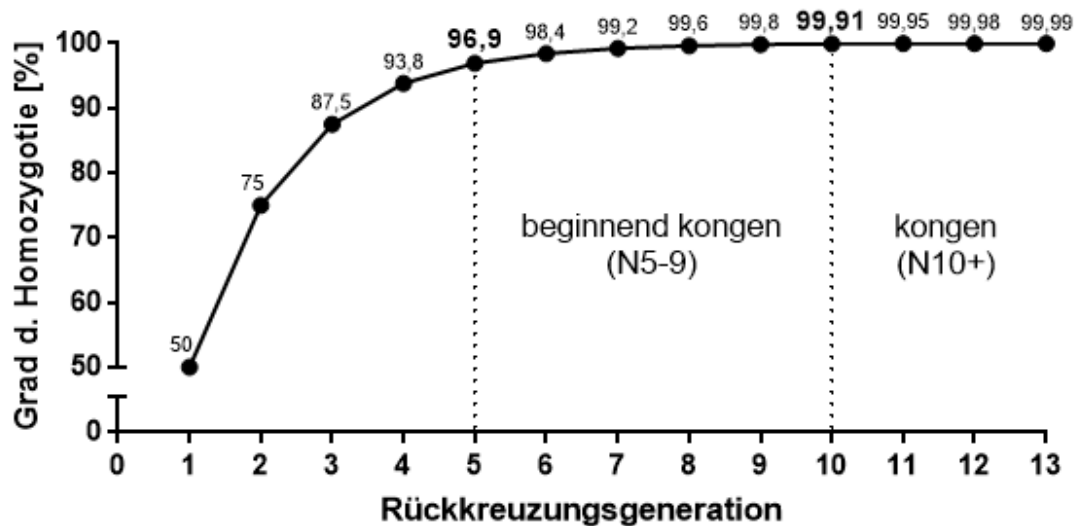


Abbildung 49: Genetischer Hintergrund. Die Grafik zeigt die Abhängigkeit zwischen der steigenden genetischen Homozygotie und der Anzahl der Rückkreuzungsgenerationen sowie die gespiegelte Exponentialfunktion der zunehmenden zurückgekreuzten Generationen an die „genetische Reinheit“. Tiere der Rückkreuzungsgenerationen <N5 weisen einen gemischten genetischen Hintergrund und einen niedrigen Grad der Homozygotie auf. Mit steigender Rückkreuzungsgeneration nimmt der Grad der „genetischen Reinheit“ zu. Nahezu vollständig zurückgekreuzte Linien (N5-9) werden als „beginnend kongen“ bezeichnet, während ab der zehnten Rückkreuzungsgeneration eine Mauslinie als vollständig zurückgekreuzt bzw. „kongen“ charakterisiert wird (Modifiziert nach einer Abbildung von The Jackson Laboratory).

Nachdem festgestellt wurde, dass die auffällige Erhöhung der Spermienanzahl in Tas2r131-defizienten Männchen mit zunehmendem Rückkreuzungsgrad auf den C57BL/6N-Stammhintergrund nicht mehr zu registrieren war, ergab sich zwangsläufig die Frage, ob das Phänomen der Genotypverschiebung zugunsten heterozygoter Nachkommen aus Zuchtpaaren mit einem Tas2r131 [+/+]-Weibchen und einem Tas2r131 [+/-]-Männchen, das ebenfalls erstmals für nicht-kongene Tiere beobachtet wurde (Meyer, 2013), auch noch in Tas2r131-Tieren mit einem fast vollständig zurückgekreuzten C57BL/6N-Hintergrund zu beobachten war. Zuchtversuche mit Tieren der sechsten Rückkreuzungsgeneration haben dazu gezeigt, dass auch in den Paaren mit höheren genetischen Hintergrund eine Genotypverschiebung zugunsten der heterozygoten Nachkommen festgestellt werden konnte, wenn das väterliche Tier ein defizientes Tas2r131-Allel trug ($p = 0,002^{**}$, Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der fehlenden Möglichkeit, mit einem spezifischen anti-Tas2r131 Antikörper zu überprüfen, ob die beobachtete Genotypverschiebung in Nachkommen aus Zuchtpaaren mit einem Wildtyp Tas2r131-Weibchen und einem heterozygoten Tas2r131-Männchen durch eine größere Population an Tas2r131 [-]-Spermien verursacht wurde, wurde als nächstes geprüft, ob in Nachkommen aus Zuchtpaaren mit mehr als einer Tas2r131-defizienten Erbanlage auch eine Genotypverschiebung zu beobachten ist. Gleichzeitig wurde untersucht, ob eine auftretende Genotypverschiebung in den Nachkommen ausschließlich dann zu registrieren ist, wenn das Männchen „defizienter“ für den Tas2r131-Genlocus ist, als das Zuchtweibchen.

Dazu wurden geschlechtsspezifische Verpaarungen mit einem Tas2r131 [-/-]-Weibchen und einem Tas2r131 [+/-]-Männchen bzw. einem Tas2r131 [+/-]-Weibchen und einem Tas2r131 [-/-]-Männchen angesetzt, und die Genotypverteilung unter den Nachkommen bestimmt. Aus Zuchtpaaren mit einem heterozygoten und einem homozygot defizienten Elternteil können, gemäß der Mendelschen Vererbungslehre, nur heterozygote und homozygot defiziente Nachkommen zu gleichen Teilen entstehen. In diesen Zuchtversuchsansätzen konnte nun bemerkenswerterweise beobachtet werden, dass erneut eine Genotypverschiebung zugunsten des „defizienteren“ Genotyps unter den Nachkommen auftrat und zwar nur dann, wenn ein heterozygotes Tas2r131-Weibchen mit einem homozygot-defizienten Männchen verpaart wurde. Anhand dieser geschlechtsspezifischen Zuchtversuche konnte somit gezeigt werden, dass der in der vorangegangenen Promotionsarbeit beobachtete Effekt der Genotypverschiebung, anders als für die Anzahl der Spermien (Meyer, 2013), nicht auf den genetischen Hintergrund der Zuchttiere, sondern tatsächlich auf eine genetische Deletion des Tas2r131-Locus zurückzuführen ist. Im Einzelnen konnte mit diesen Zuchtversuchen deutlich gezeigt werden, dass der Effekt der Genotypverschiebung nur dann auftritt, wenn das Zuchtmännchen gegenüber dem Zuchtweibchen „Tas2r131-defizienter“ ist. Diese Beobachtung führt zu der Theorie, dass heterozygote bzw. homozygot defiziente Tas2r131-Männchen die Tas2r131-defiziente Erbinformation vermehrt und/oder vereinfacht an ihre Nachkommen weitergeben. Unerklärlich ist jedoch bisher, warum eine derartige Verschiebung der Genotypverteilung in den Nachkommen von Tas2r131 [+/-] x [+/-]-Verpaarungen, für die eine Verteilung von 25:50:25 (+/+ : +/- : -/-) erwartet wird, nicht zu beobachten ist (Abbildung 14).

Bei genauerer Analyse der Tas2r131-Zuchtdaten fiel in diesem Zusammenhang außerdem auf, dass die aufgrund der beobachteten Genotypverschiebung untersuchten Tas2r131-Zuchtpaarkombinationen (Tas2r131 [+/-] x [-/-], [-/-] x [+/-]) mehr Nachkommen zeugen als vergleichende C57BL/6N-Zuchtpaare (Abbildung 14). Hierbei war jedoch eine Zunahme der

Wurfgröße nicht ausschließlich in den Tas2r131 $+/+$ x $-/-$ -Zuchtpaaren zu registrieren, die bereits durch die Genotypverschiebung unter den Nachkommen auffielen, sondern auch in Tas2r131 $-/-$ x $+/+$ -Verpaarungen. Daher können die erhöhte Wurfgröße und die Genotypverschiebung in den Tas2r131-Zuchtanalysen nicht in Relation gesetzt werden. Allerdings zeigte sich, dass in weiteren Untersuchungen zum Tas2r131-Reproduktionsphänotyp auch eine derartige Zunahme der Wurfgröße in Tas2r131 $+/+$ x $+/+$ - und $-/-$ x $-/-$ -Zuchtpaaren zu erkennen ist, die im Vergleich zur C57BL/6N-Wurfgröße sogar signifikant erhöht ist (Tabelle 5). Dieses Phänomen, das nicht mit einer geringeren Vitalität der Jungtiere einhergeht (Abbildung 15), und dadurch eine kompensatorische Hochregulierung der Geburtenrate zur Arterhaltung ausschließt, ist insofern äußerst interessant, da es erstmals zeigt, dass das Fehlen eines einzigen gustatorischen Rezeptors Einfluss auf die Populationsgröße hat. Welche Rolle dabei allerdings der Bitterrezeptor Tas2r131 spielt, dessen genetische Deletion scheinbar zu einem Selektionsvorteil führt, bleibt unklar. Um sicherzustellen, dass die Beobachtung der Wurfgrößen-Zunahme unabhängig vom genetischen Hintergrund stattfindet und nicht auf den Vergleich von Tas2r131-Zuchtdaten mit denen der C57BL/6-Mauslinie zurückzuführen ist, müssen weitere Zuchtanalysen von Tas2r131 $+/+$ x $+/+$ durchgeführt werden.

Das Vererbungsgesetz von Mendel postuliert eine gleich hohe Wahrscheinlichkeit der Vererbung für beide Allele eines Elternteils (Aparicio et al., 2010). Dennoch konnte für die genmanipulierte Tas2r131^{-BL-IRES-hrGFP}-Mauslinie, unabhängig vom genetischen Hintergrund, eine Abweichung von dieser Regel festgestellt werden. Außerdem zeigten die durchgeführten Studien, dass der haploide Tas2r131-defiziente Chromosomensatz mit einer 50 %-übersteigenden Wahrscheinlichkeit vom väterlichen Tier an die Nachkommen weitergegeben wird (Abbildung 14). Eine Begründung dafür kann auf mehreren Ebenen gesucht werden (Abbildung 50).

Ein möglicher Auslöser für die beobachtete Genotypverschiebung (engl.: *transmission ratio distortion*; TRD) könnte bereits im Beginn der Keimbahn, während der ersten mitotischen Teilung der Spermatogonien zu finden sein (Aparicio et al., 2010; Huang et al., 2013; Pardo-Manuel de Villena and Sapienza, 2001). Dieser Prozess ist stark Testosteron-abhängig und könnte zu einer veränderten Mitoserate in den frühen, männlichen Keimzellen (Spermatogonien) führen (Walker, 2011). Bestimmungen der Testosteronkonzentration im Blutserum von Tas2r131 $-/-$ Männchen ergaben jedoch keinen Hinweis auf eine signifikant veränderte Testosteronsynthese (Tabelle 7).

In der post-mitotischen Phase entstehen während der zwei Meiose-Stadien aus einem diploiden Spermatogonium zwei haploide Spermatozyten (Meiose I) bzw. vier haploide Spermatiden (Meiose II). Im Regelfall findet eine gleichmäßige Verteilung der Chromosomen bzw. Allele auf die Tochterzellen statt (im Weibchen: eine Eizelle und drei Polkörperchen; im Männchen: vier Spermatiden) (Campbell et al., 2006). Während der Segregation in der Reifeteilung kann es jedoch zu einer genetischen Fehlverteilung, einer sogenannten *non-random segregation* kommen (Aparicio et al., 2010; Lyttle, 1991; Pardo-Manuel de Villena and Sapienza, 2001). Eine bis dato noch fehlende chromosomale Analyse der Tas2r131-defizienten Tiere könnte Aufschluss darüber geben, ob während der Meiose genetische Dysfunktionen auftreten, die zu einer Chromosomenaberration (z. B. Translokation, Genkonversion) und dadurch, unabhängig vom genetischen Hintergrund der Tiere, zu einer fehlerhaften Segregation führen könnten.

Da das Phänomen der TRD in dieser Arbeit nur dann beobachtet werden konnte, wenn das Zucht-Männchen mehr *Tas2r131*-defiziente Allele trug als das Zucht-Weibchen (Abbildung 14), wurde überprüft, ob der männliche haploide, *Tas2r131*-defiziente Chromosomensatz vermehrt an männliche Nachkommen vererbt wird. Dadurch wäre eine Kopplung des *Tas2r131*-Gens, das allerdings auf Chromosom 6 lokalisiert ist, an das männliche Geschlechtschromosom indiziert. Die durchgeführte Analyse ergab jedoch für keine der untersuchten und auffallenden geschlechtsspezifischen Verpaarungsansätze zusätzlich eine erhöhte Geburtenrate von Männchen (Tabelle 6). Auch eine vermehrte Bildung von *Tas2r131* [-]-Spermien konnte nicht bestätigt werden (Tabelle 7).

Der Ursprung, der von den Mendelschen Vererbungsregeln abweichenden Weitergabe genetischer Informationen kann jedoch auch in der post-meiotischen Phase vor der Befruchtung liegen. Hierbei kann ein selektiver Prozess unter den Gameten auftreten, der dazu führt, dass Keimzellen mit einem bestimmten haploiden Chromosomensatz häufiger bzw. seltener im Befruchtungsprozess involviert sind (Huang et al., 2013; Pardo-Manuel de Villena and Sapienza, 2001). Eine veränderte testikuläre Apoptoserate, die auf die Anzahl der Keimzellen Einfluss hat, könnte auf eine derartige Selektion hindeuten. In den durchgeführten TUNEL-Analysen an *Tas2r131*-Hodengewebe wurde jedoch keine auffallend veränderte Rate des Zelltodes von männlichen Keimzellen festgestellt (Abbildung 17). Die Möglichkeit einer erhöhten Motilität und dadurch eines selektiven Vorteils der *Tas2r131*-defizienten- gegenüber *Tas2r131*-positiven Spermien wurde mit Hilfe von CASA-Motilitäts-Analysen ausgeschlossen, da kein verändertes Bewegungsmuster bzw. -geschwindigkeit festgestellt werden konnte (Abschnitt 4.1.2).

Um zu überprüfen, ob der direkte Befruchtungsprozess mit der vorangegangenen Akrosomreaktion durch die *Tas2r131*-Gendeletion positiv beeinflusst sein könnte, wurde zum einen die Funktionalität der Exozytosemaschinerie evaluiert, und zum anderen die Reaktivität der Spermien mit dem natürlichen Stimulus der *Zona pellucida* getestet. Während durch die Deletion der *Tas2r131*-codierenden Sequenz keinerlei Veränderungen im Ablauf der Akrosomreaktion (Abbildung 19) bzw. in der, die Akrosomreaktion-auslösenden, Ca^{2+} - und cAMP-abhängigen Signalkaskade (Abbildung 21 und Abbildung 22) zu beobachten waren, wurde durch die Stimulation der Spermien mit isolierter *Zona pellucida* eine leicht erhöhte Akrosomreaktionsrate in *Tas2r131*-defizienten Spermien festgestellt (Abbildung 20). Diese Beobachtung basierte jedoch auf Daten von lediglich drei *Tas2r131* [+/-]- bzw. sieben *Tas2r131* [-/-]-Männchen, so dass weiterführende Untersuchungen notwendig sind, um dieses Ergebnis zu validieren. Im Falle einer Bestätigung des präsentierten Ergebnisses wäre es möglich, dass die beobachtete Genotypverschiebung in den geschlechtsspezifischen Zuchtpaaren durch eine erhöhte Sensitivität der *Tas2r131*-defizienten Spermien gegenüber der Eihülle und dadurch durch eine häufigere Befruchtung einer Eizelle verursacht ist.

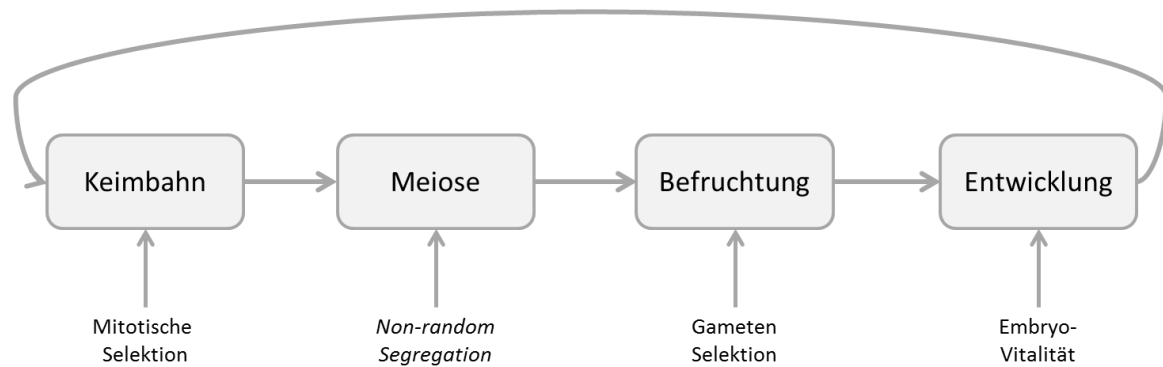


Abbildung 50: Mögliche Ursachen der *transmission ratio distortion*. Während der mitotischen und meiotischen Reifung von Keimzellen sowie des Befruchtungsprozesses und der Embryonalentwicklung kann es zu selektiven Mechanismen kommen, die zu einer Verschiebung der erwarteten Mendelschen Genotypverteilung unter Nachkommen führen (engl.: *transmission ratio distortion*; TRD). Abweichungen von der Norm können durch eine fehlerhafte Mitose in den Keimzellen, jedoch auch durch eine genetische Fehlverteilung während der Meiose („*non-random segregation*“) verursacht werden. Auf post-meiotischer Ebene können Prozesse, die auf die Gameten-Selektion, und dadurch auf die Befruchtung Einfluss haben, sowie pathophysiologische Effekte, die die Embryo-Entwicklung stören können, Veränderungen in der Genotypverteilung der Nachkommen hervorrufen (Modifiziert nach Huang et al., 2013; Pardo-Manuel de Villena and Sapienza, 2001).

Unabhängig von den vorher genannten ursächlichen Möglichkeiten einer TRD kann es auch durch eine post-zygotische Selektion zugunsten eines bestimmten Genotyps zur Abweichung von den Mendelschen Vererbungsregeln kommen (Huang et al., 2013; Lyon, 2003; Pardo-Manuel de Villena and Sapienza, 2001). Diese würde sich z. B. in einer veränderten Embryo-Vitalität widerspiegeln (Aparicio et al., 2010). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings keine embryonalen Untersuchungen durchgeführt wurden, kann zwar keine Aussage darüber getroffen werden, ob in bestimmten Zuchtansätzen eine höhere Embryonen-Letalität zu beobachten ist; jedoch kann anhand der postnatalen Mortalitätsrate unter den Jungtieren in den ersten drei Lebenswochen indirekt abgeleitet werden, ob die Vitalität von Jungtieren bestimmter Zuchtpaare herabgesetzt ist. Unter den Nachkommen der Zuchtpaare, in denen eine signifikante Genotypverschiebung beobachtet wurde, wurde jedoch kein einheitlicher Befund bezüglich der Sterblichkeitsrate registriert (postnatale Mortalitätsrate pro Wurf: Tas2r131 [+/-] ♀ x [+/-] ♂: $11,4 \pm 4,3$ %; Tas2r131 [+/-] ♀ x [-/-] ♂: $4,6 \pm 4,5$ %).

Unter der Annahme, dass das anstelle des Tas2r131 exprimierte hrGFP biologisch inaktiv ist (Kam et al., 2013), kann zusammenfassend festgehalten werden, dass der Tas2r131-Bitterrezeptor im männlichen Reproduktionsgewebe exprimiert wird und, unabhängig vom genetischen Hintergrund der untersuchten Tiere, Einfluss auf den Genotyp der Nachkommen zu haben scheint. Auf welchen genauen reproduktionsrelevanten Mechanismus die genetische Deletion des Tas2r131 Auswirkungen hat, kann anhand der hier präsentierten Ergebnisse jedoch nicht mit eindeutiger Sicherheit abschließend geklärt werden.

5.1.2 Reproduktionsbiologische Funktion des TRPM5 im Zusammenspiel mit Geschmacksrezeptoren

5.1.2.1 Reproduktionsphänotyp von TRPM5-defizienten Männchen

Mausmodelle, in deren Genom die codierende Sequenz für ein einzelnes auch im männlichen Reproduktionssystem exprimiertes gustatorisches Signalprotein fehlt (z. B. Tas1r1, Tas1r3, Tas2r131, α -Gustducin), zeigen einen milden Reproduktionsphänotyp (Meyer et al., 2012; Mosinger et al., 2013). Erst die gemeinsame Deletion des Tas1r3 und α -Gustducin lösen in männlichen Mäusen eine funktionelle Sterilität aus, deren genaue Ursache jedoch noch nicht vollständig geklärt ist (Mosinger et al., 2013). Da dieser Befund erstmals eine funktionelle Kopplung gustatorischer Signalproteine außerhalb der Mundhöhle andeutet und auf eine Signaltransduktion im männlichen Reproduktionsgewebe hinweist, die der oralen gustatorischen Signalkaskade ähnelt, wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese überprüft, ob das gemeinsame Ausschalten von Geschmacksrezeptoren für die Umami- bzw. Bitter-Perzeption und dem für die Wahrnehmung dieser Geschmacksmodalitäten essentiellen TRPM5 auch zur Sterilität männlicher Mäuse führt. Eine Bestätigung dieser Hypothese könnte dann darauf hindeuten, dass in murinen männlichen Geschlechtsorganen tatsächlich eine Signaltransduktion stattfindet, die der gustatorischen Signalkaskade in der Mundhöhle ähnelt.

Zur Evaluation eines möglichen Reproduktionsphänotyps von Tas1r1-TRPM5- bzw. Tas2r131-TRPM5-Doppel-*knockout*-Mäusen wurde zunächst die genaue zelluläre Lokalisation des TRPM5 im männlichen Reproduktionsgewebe bestimmt und dann einige wichtige reproduktionsbiologische Parameter an TRPM5-*knockout*-Mäusen erhoben.

In initialen TRPM5-Lokalisationsstudien konnte die Lokalisation des gustatorischen Ionenkanals in den Leydig Zellen und den späten Spermatogenesephasen innerhalb der *Tubuli seminiferi* sowie im Akrosom und dem Flagellum-Hauptstück von Spermien gezeigt werden (Abbildung 24). Aufgrund des TRPM5-Nachweises in Testosteron-produzierenden Leydig Zellen, scheint eine Beteiligung des Ionenkanals an der Testosteron-Synthese bzw. Testosteron-Sekretion im Hodengewebe wahrscheinlich, wobei die Expression des TRPM5 im Akrosom und dem Spermenschwanz zusätzlich auf eine Funktion des TRPM5 für die Akrosomreaktion oder auch die Motilität der Spermien hindeutet.

Parallel zu den Expressionsanalysen wurden die Zuchtdaten von TRPM5-*knockout* Mäusen ausgewertet. Dabei zeigte sich jedoch, dass die TRPM5-defizienten Mäuse, trotz des geringen Testosteronlevels im Blutplasma (Abbildung 38), keine auffällige Fertilitätseinschränkung zeigen (Abbildung 26). Im Verlauf der Zucht von TRPM5-defizienten Mäusen fiel zusätzlich eine erhöhte postnatale Mortalität der Jungtiere auf (Abbildung 26). Als Ursache für eine erhöhte Sterberate bei Nachkommen wird häufig eine aktive Kindstötung durch die Elterntiere vermutet, da oft angenagte, oder sogar ganz aufgefressene Jungtiere registriert werden. Diesem Verdacht liegt jedoch bisher kein wissenschaftlicher Beleg zugrunde (Weber et al., 2013). Zwar gibt es Hinweise darauf, dass weibliche Hamster durch Tötung aktiv die Wurfgröße reduzieren, um so die Aufzucht der überlebenden Jungtiere zu sichern (Day and Galef, 1977); jedoch war in TRPM5-*knockout* Zuchtpaaren keine Zunahme der Wurfgröße zu beobachten (Abbildung 26), die eine Tötung der Jungtiere aufgrund mangelnder Versorgung rechtfertigen würde. Daher kann eine Tötung der Nachkommen durch die Elterntiere als Grund für die beobachtete, erhöhte Sterberate bei TRPM5-defizienten Mäusen ausgeschlossen werden.

Als weitere Ursache für die reduzierte Überlebensrate der TRPM5 $[-/-]$ -Jungtiere kämen allerdings noch folgende andere Gründe in Betracht: Infektionen, Verletzungen, Unterernährung, Unterkühlung und/oder fehlende mütterliche Fürsorge (Mellor and Stafford, 2004). Obwohl eine durch die TRPM5-Deletion verursachte pathophysiologische Veränderung der inneren Organe bis *dato* nicht untersucht wurde und daher als Grund für die beobachtete erhöhte Sterblichkeit der Jungtiere nicht final ausgeschlossen werden kann, konnten bei den hier untersuchten TRPM5-defizienten Mäusen keinerlei äußerlich erkennbare Auffälligkeiten oder sichtbare Infektionen ausgemacht werden.

Eine mögliche Unterernährung der TRPM5 $[-/-]$ -Jungtiere als Ursache für die erhöhte Sterberate kann ebenfalls weitestgehend ausgeschlossen werden, da unter den verstorbenen Tieren kein visueller Gewichtsverlust wahrgenommen wurde. Häufig führt auch ein fehlendes/eingeschränktes Nistverhalten des Muttertiers zum frühzeitigen Tod der Nachkommen (Weber and Olsson, 2008). Ein derartiges Fehlverhalten wurde jedoch durch das geschulte Tierpflegepersonal auch nicht erkannt.

Da Jungtiere allerdings in den ersten zwölf Lebenstagen gänzlich von der mütterlichen Pflege abhängig sind, müssen sie in der Lage sein, über innerartliche Kommunikation auf sich aufmerksam zu machen (Cohen-Salmon et al., 1985; Ehret and Bernecker, 1986; König and Markl, 1987). Es könnte daher z. B. möglich sein, dass TRPM5-defiziente Jungtiere nicht imstande sind, dem Muttertier das Verlassen des Nests zu signalisieren, so dass eine vermehrte Unterkühlung der Jungtiere als Ursache für die erhöhte postnatale Mortalitätsrate in Betracht gezogen werden könnte. In diesem Zusammenhang ist wichtig zu erwähnen, dass der TRPM5 nicht nur an der Wahrnehmung von Geschmacksstoffen beteiligt ist, sondern offenbar auch für die Erkennung von Pheromonen essentiell zu sein scheint (Lopez et al., 2014; Oshimoto et al., 2013). Damit ist durchaus vorstellbar, dass es aufgrund der TRPM5-Deletion zu einer fehlenden innerartlichen Kommunikation/Erkennung zwischen dem Muttertier und den Jungtieren und damit zu einer mangelnden Versorgung des Wurfs durch das Muttertier kommen kann. Dieses Phänomen wurde auch bereits für G_{olf}^- und ACIII-defiziente Zuchtweibchen beschrieben, bei denen weder ein ausgeprägtes Nistverhalten noch eine mütterliche Fürsorge erkannt wurde. Aufgrund der fehlenden olfaktorischen Signalproteine G_{olf}^- und ACIII ist die Detektion von Odorantien und Pheromonen eingeschränkt, so dass dadurch eine innerartliche Bindung womöglich nicht zustande kommen kann (Belluscio et al., 1998; Lopez et al., 2014; Wang and Storm, 2011).

Funktionelle Analysen bezüglich der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Einzelzellmessungen an TRPM5-defizienten Spermien ergaben ein leicht erhöhtes Ca^{2+} -Basallevel in unkapazitierten Spermien und sogar ein signifikant erhöhtes basales Ca^{2+} -Level in kapazitierten TRPM5 $[-]$ -Spermien (Abbildung 27 A). Eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration könnte in TRPM5-defizienten Spermien zu einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species*; ROS) führen, die Zellschäden verursachen und dadurch apoptotische Reaktionen induzieren können (Cali et al., 2012; de Liz Oliveira Cavalli et al., 2013; Kim et al., 2013). Zwar wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geprüft, ob das leicht erhöhte Ca^{2+} -Level in den TRPM5-defizienten Spermien tatsächlich zu einer verstärkten ROS-Bildung führt; allerdings zeigten die hier vorgestellten quantitativen Apoptose-Studien tatsächlich, dass in TRPM5-defizienten Männchen häufiger apoptotische Ereignisse während der Spermatogenese zu registrieren sind (Abbildung 36). Die leicht erhöhte Apoptoserate scheint allerdings während

der Spermatogenese in TRPM5-*knockout* Männchen noch nicht so ausgeprägt, dass sie sich in einer reduzierten Anzahl epididymaler Spermien widerspiegelt (Tabelle 9).

Die Ursache für die gemessene, erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in kapazitierten TRPM5 [-]-Spermien könnte ein verändertes Membranpotential in den Spermien sein. Arbeiten über den TRPM4 in Mastzellen zeigten, dass in TRPM4-defizienten Zellen eine anhaltende Hyperpolarisation (geringes Membranpotential) und ein erhöhter Ca^{2+} -Einstrom zu beobachten ist (Vennekens et al., 2007; Zhang, 2007). Der TRPM4, der, wie der TRPM5, Ca^{2+} -gesteuert ist und monovalente Kationen leitet, ist der nächste Verwandte des TRPM5-Ionenkanals und zeigt 40 % Sequenzhomologie bezüglich der Aminosäuresequenz (Liman, 2014). Mit diesen Informationen und der signifikant erhöhten Ca^{2+} -Konzentration in kapazitierten TRPM5-defizienten Spermien erscheint es plausibel, dass auch der TRPM5 Auswirkungen auf das Membranpotential der männlichen Keimzellen haben könnte, und die TRPM5-Deletion in Spermien zu einer verlängerten Hyperpolarisation führt, die einen vermehrten/längeren Influx von Ca^{2+} -Ionen induziert (Strünker et al., 2006). Zur Bestätigung dieser Hypothese sind allerdings Potentialmessungen an TRPM5-defizienten Spermien notwendig.

Die durch den Vorgang der Kapazitierung hervorgerufene Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung in Spermien ist notwendig für den sich anschließenden Ablauf der Akrosomreaktion (Breitbart, 2002a; de Lamirande et al., 1997). Versuche, die zeigen sollten, ob in TRPM5-defizienten Spermien die molekulare Maschinerie der Akrosomreaktion beeinträchtigt ist, ließen keine Störung erkennen (Abbildung 27). Jedoch zeigte sich, dass im zeitlichen Verlauf der spontanen Akrosomreaktion TRPM5 [-]-Spermien tendenziell häufiger spontan ihr Akrosom verloren als Spermien der Kontrollgruppe (Abbildung 27). Diese Beobachtung könnte mit den erhöhten basalen Ca^{2+} -Konzentrationen in Verbindung stehen, hat aber offenbar keinerlei Auswirkung auf die Fertilisation.

5.1.2.2 Reproduktionsphänotyp von *TasR*-TRPM5-defizienten Männchen

Entgegen der festgestellten Sterilität von *Tas1r3-α*-Gustducin-Doppel-*knockout*-Männchen (Mosinger et al., 2013) sind sowohl *Tas1r1*-TRPM5- als auch *Tas2r131*-TRPM5-Doppel-*knockout*-Männchen fertil. *Tas1r1*-TRPM5-Doppel-*knockout*-Männchen zeigen jedoch einen stärkeren pathophysiologischen Reproduktionsphänotyp als die parallel hergestellten *Tas2r131*-TRPM5-Doppel-*knockout*-Männchen.

Zusammenfassend wurden folgende auffällige Reproduktionsparameter für die beiden neu generierten Doppel-*knockout* Mauslinien erfasst: Es fiel beispielsweise auf, dass der zeitliche Abstand zwischen zwei Würfen von monogam verpaarten *Tas1r1*-TRPM5-defizienten Zuchtpaaren deutlich länger ist als bei den vergleichbaren Kontroll-Mauslinien (C57BL/6N, *Tas1r1*^{BL-IRES-mcherry}, *Tas2r131*^{BL-IRES-hrGFP}, TRPM5-*knockout*) (Tabelle 8). Eine derartige Wurfverzögerung konnte auch in *Tas2r131*-TRPM5-Doppel-*knockout*-Zuchtpaaren beobachtet werden, wenn auch nicht so ausgeprägt wie für die *Tas1r1*-TRPM5-Doppel-*knockout*-Zuchtpaare. Da dieser Effekt nicht in den *knockout*-Mauslinien für einzelne gustatorische Signalproteine (*Tas1r1*^{BL-IRES-mcherry}, *Tas2r131*^{BL-IRES-hrGFP}, TRPM5-*knockout*) und die Wildtyp-Mauslinie C57BL/6N zu registrieren war, muss davon ausgegangen werden, dass der gemessene verlängerte Zeitabstand zwischen zwei Würfen eine Auswirkung der gleichzeitigen Deletion der Rezeptoren (*Tas1r1*- bzw. *Tas2r131*) mit dem TRPM5 ist.

Leider konnte mit den bisherigen Untersuchungsmethoden keine Aussage darüber getroffen werden, ob der verlängerte Abstand zwischen zwei Würfen in TasR-TRPM5-Doppel-*knockout*-Zuchtpaaren durch eine Verlängerung der Gravidität, eine reduzierte Fertilität oder einen herabgesetzten Sexualtrieb verursacht ist. Da Mäuse nachaktive Tiere sind und die Kopulation daher auch in der Nacht stattfindet, könnte allerdings durch die morgendliche Erfassung eines Vaginalpfropfs (vaginale Plug-Analysen) der Weibchen festgestellt werden, ob das Paarungsverhalten durch eine TRPM5-Deletion beeinträchtigt ist (Hartung and Dewsbury, 1978). Auf diese Weise wäre es möglich festzustellen, ob die Ursache für den längeren Wurfabstand pathophysiologisch- oder psychosozial-bedingt ist.

Ähnlich wie für die TRPM5-defizienten Jungtiere zeigten auch Nachkommen der TasR-TRPM5-Doppel-*knockout*-Mauslinie eine deutlich reduzierte Lebensrate in den ersten drei Wochen nach der Geburt (Abbildung A). Zudem hat die Datenanalyse gezeigt, dass bei den TRPM5-*knockout*- und TasR-TRPM5-Doppel-*knockout*-Mauslinien häufig alle Nachkommen eines Wurfs verstarben, wohingegen in den Kontroll-Mauslinien überwiegend Einzeltiere verstarben (Abbildung B). Diese Beobachtung könnte auf die bereits zuvor erwähnte fehlende mütterliche Fürsorge hindeuten, die vermutlich ausschließlich durch den fehlenden TRPM5-Ionenkanal verursacht wird, da nur in TRPM5 $[-/-]$ -Zuchtpaaren, aber nicht in homozygot defizienten Tas1r1- bzw. Tas2r131 $[-/-]$ -Verpaarungen eine erhöhte Sterblichkeitsrate registriert wurde.

Der während der Akrosomreaktion ablaufende proteolytische Verdau der *Zona pellucida* ermöglicht die Fusion von Spermium und Eizelle. Da eine Fehlfunktion während dieses exozytotischen Prozesses zur Einschränkung der Fruchtbarkeit führen kann (Esteves and Verza Jr, 2011), könnte eine akrosomale Reaktionsstörung eine Erklärung für die verlängerte Zeit zwischen zwei Würfen in Tas1r1-TRPM5-Doppel-*knockout*-Zuchtpaaren sein. Daher wurde die Funktionalität der akrosomalen Exozytose-Maschinerie überprüft und festgestellt, dass Tas1r1-TRPM5-defiziente Spermien etwas schlechter auf den Stimulus A23187 reagierten als Vergleichsgruppen (Abbildung 32). Möglicherweise deutet dies darauf hin, dass in Tas1r1-TRPM5-Doppel-*knockout*-Spermien die nachgeschaltete Signalkaskade der Akrosomreaktion beeinträchtigt und dadurch die Wahrscheinlichkeit der Eizellbefruchtung verringert ist.

Da es sich bei der A23187-induzierten Akrosomreaktion um einen artifiziellen Stimulus handelt, wurden auch Daten von spontanen exozytotischen Ereignissen während der *in vitro* Inkubation erhoben. In TRPM5-*knockout*- und TasR-TRPM5-Doppel-*knockout*-Spermien konnte dabei eine erhöhte Akrosomreaktion nachgewiesen werden (Abbildung 33). Diese Ergebnisse erscheinen vorerst widersprüchlich, da in TRPM5-Doppel-*knockout*-Spermien einerseits eine verringerte Induzierbarkeit der Akrosomreaktion festgestellt wurde, und andererseits ein erhöhter spontaner Verlust des Akrosoms registriert werden konnte. Zur Klärung dieses Sachverhalts sind daher weitere Untersuchungen notwendig.

Neuesten Untersuchungen zufolge findet die Akrosomreaktion für einen Großteil der Spermien bereits im oberen Bereich des Isthmus und nicht erst in der Ampulle statt (La Spina et al., 2016). Da für die Befruchtung einer Eizelle nur ein Spermium benötigt wird, könnte der Prozess des vorzeitigen akrosomalen Verlusts einen selektiven Effekt haben, der sicherstellt, dass ausschließlich vollkommen funktionsfähige Spermien die Eizelle in der Ampulle des weiblichen Genitaltrakts erreichen. Da in allen untersuchten kapazitierten Spermien, in denen keine genetische Information für den TRPM5 mehr vorliegt (TRPM5- und Tas1r1-TRPM5- bzw.

Tas2r131-TRPM5-defiziente Spermien), eine gleichermaßen erhöhte Akrosomreaktion festzustellen ist, scheint der fehlende TRPM5-Ionenkanal die Ursache dafür zu sein, ebenso wie für das registrierte, größere Spermienkopfvolumen in TRPM5- und Tas1r1-TRPM5- bzw. Tas2r131-TRPM5-defizienten Spermien (Abbildung 34). Eine vermehrte selektive „Ausmusterung“ von TRPM5-defizienten Spermien durch eine erhöhte spontane Akrosomreaktionsrate müsste jedoch in den analysierten Zuchtdaten ersichtlich sein, bei denen aber keine Fertilitätseinschränkung zu erkennen ist. Da die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zum Einfluss des TRPM5-Ionenkanals und der Geschmacksrezeptoren Tas1r1 und Tas2r131 auf die Akrosomreaktion nicht signifikant unterschiedlich und dadurch nicht eindeutig waren, sind zur Klärung dieses Aspekts weitere Untersuchungen notwendig.

Der längere Abstand zwischen zwei Tas1r1-TRPM5-Doppel-*knockout*-Würfen ist einer der wenigen reproduktionsrelevanten Aspekte, die ausschließlich in Zuchtpaaren mit Tas1r1- und TRPM5-defizienten Tieren zu registrieren ist. In diesem Zusammenhang ist außerdem auffällig, dass die Männchen der Tas1r1-TRPM5-Doppel-*knockout*-Mauslinie zusätzlich durch eine altersunabhängige, reduzierte Spermienanzahl hervorstechen (Tabelle 9 und Abbildung 35). Eine verminderte Anzahl an männlichen Keimzellen könnte die mögliche Ursache für die beobachtete, längere Zeit zwischen zwei Würfen von Tas1r1-TRPM5-defizienten Zuchtpaaren sein (Tabelle 8). Diese Theorie könnte durch noch fehlende vaginale Plug-Analysen unterstützt werden, die Aufschluss darüber geben könnten, ob der verlängerte Wurfabstand in Tas1r1-TRPM5-*knockout*-Zuchtpaaren durch weniger häufig vorkommende Kopulationen verursacht wird, oder aber durch Paarungsversuche von Männchen mit einer reduzierten Anzahl an Spermien.

Während Tas1r3- α -Gustducin-Doppel-*knockout*-Männchen steril sind (Mosinger et al., 2013), was auf die gemeinsame Bedeutung beider gustatorischen Signalmoleküle für die männliche Fertilität hinweist, zeigen Tas1r1-TRPM5-Doppel-*knockout*-Männchen einen milden Phänotyp. Aufgrund der Hypothese, dass im männlichen Reproduktionstrakt eine, der gustatorischen Signaltransduktion sehr ähnlichen, Signalweiterleitung erfolgt, könnte der schwach ausgeprägte Phänotyp der Tas1r1-TRPM5-Doppel-*knockout*-Mäuse auf eine mögliche Kompensation des Tas1r1 durch den für den Umami-Geschmack essentiellen Tas1r3 zurückzuführen sein. Umgekehrt scheint aufgrund der festgestellten Sterilität in Tas1r3- α -Gustducin-defizienten Männchen eine Tas1r3-Kompensation durch den Tas1r1 nicht zu erfolgen bzw. nicht ausreichend genug zu sein, um die beobachtete Fertilitätsstörung zu verhindern. Ein derartiger kompensatorischer Effekt, bei dem die Funktion eines fehlenden Proteins durch die Aktivität eines Proteins aus der gleichen Proteinfamilie ausgeglichen wird (Müller, 1999), wurde bereits bei G-Proteinen (Gohla et al., 2007; Young et al., 2011) und TRPs (Dietrich et al., 2005) beobachtet. Die Tatsache, dass die Deletion des TRPM5 und des Tas1r1 alleine zu keiner gravierenden Beeinträchtigung der Fertilität führt, erinnert ebenfalls an die Tas1r3- α -Gustducin-defizienten Männchen, die erst bei der gemeinsamen Deletion der entsprechenden codierenden Sequenzen eine Fertilitätsstörung zeigten (Mosinger et al., 2013), wohingegen Mauslinien der einzelnen Gen-Deletionen keinerlei Auffälligkeiten erkennen ließen.

Während von den beiden neu generierten TasR-TRPM5-Doppel-*knockout*-Mauslinien die Tas1r1-TRPM5-defizienten Männchen einen stärkeren Reproduktionsphänotyp aufweisen, verhalten sich die Tas2r131-TRPM5-defizienten Männchen unauffällig. Dies bedeutet allerdings nicht, dass z. B. der Tas2r131 keine physiologische Relevanz für die Reproduktion hat. Dadurch dass der

Tas2r131 zur Familie der Bitterrezeptoren gehört, die mit mehr als 30 Mitgliedern deutlich größer ist, als die der Tas1R-Familie, könnte die Funktion des deletierten Tas2r131 leicht durch die Expression bzw. die Hochregulation eines anderen Familienmitglieds ausgeglichen werden (Müller, 1999). Dies widerspricht allerdings der ursprünglichen Annahme, dass der Tas2r131 Bitterrezeptor eine besondere Funktion in männlichen Reproduktionsorganen zu haben scheint, da vorausgegangene Untersuchungen eine besonders hohe Tas2r131-mRNA Konzentration in Hoden zeigten (Meyer, 2013). Für die weitere Charakterisierung dieses Rezeptors und der Untersuchung einer potentiellen Tas2r131-Kompensation durch andere Mitglieder der Bitterrezeptorfamilie, sind daher quantitative Expressionsanalysen des Tas2r131 in testikulären Gewebe erforderlich.

Für initiale Untersuchungen zur Konzentration des spermienbildenden Hormons Testosteron in TRPM5-defizienten Männchen wurden massenspektrometrische Analysen an Plasmaproben von 17 TRPM5-defizienten Männchen durchgeführt und mit Werten von 16 C57BL/6N-Männchen verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Testosteronkonzentration in ca. 40 % der untersuchten TRPM5-defizienten Proben unterhalb der technischen Nachweisgrenze lag, wohingegen von den analysierten Kontrollproben nur ca. 19 % aufgrund einer zu geringen Testosteronkonzentration nicht messbar waren. Dieses erste Anzeichen einer reduzierten Testosteronkonzentration im Blutplasma von TRPM5-defizienten Männchen wurde durch genaue Messwerte bestätigt, da in männlichen Mäusen, die keinen TRPM5-Ionenkanal exprimieren, ungefähr nur halb so viel Testosteron im Blutplasma nachgewiesen werden konnte wie in der Kontrollgruppe (Abbildung 38). Aufgrund dieses interessanten Befunds, der erstmals eine Verknüpfung von gustatorischen Signalproteinen und dem Fertilitätspotential einer Maus auf endokriner Ebene zulässt, muss die Konzentration dieses für die Spermatogenese relevanten Steroids auch in Tas1r1-TRPM5-Doppel-*knockout*-Männchen bestimmt werden, so dass möglicherweise eine der beobachteten Auffälligkeiten (z. B. reduzierte Spermienanzahl) begründet werden kann. Testosteron wird im Interstitialraum in den Leydig Zellen synthetisiert (Trottmann et al., 2010; Walker, 2011), in denen auch der TRPM5 exprimiert wird (Abbildung 24). Eine medizinische Ursache für den Testosteronmangel in TRPM5-*knockout*-Mäusen könnte daher eine endokrine Funktionsstörung in den Männchen sein, die zu einem Hypogonadismus führt.

Es gibt drei unterschiedliche Formen dieser Testosteron-Unterfunktion: primärer (hypergonadotrop), sekundärer (hypogonadotrop) und tertiärer (hypogonadotrop) Hypogonadismus (Kohn, 2004). Die Ätiologie aller Hypogonadismus-Varianten ist unterschiedlich, wobei anhand weiterer und bisher noch fehlender, hormoneller Untersuchungen (FSH, LH, GnRH, Prolaktin und Sexualhormon-bindendes Globulin (SHBG)) festgestellt werden kann, um welche Form es sich bei den männlichen TRPM5-*knockout*-Mäusen (und später Tas1r1-TRPM5-Doppel-*knockout*-Männchen) handelt.

Der primäre Hypogonadismus beruht auf einer testikulären Funktionsstörung, die u. a. durch eine Schädigung oder ein Fehlen der Leydig Zellen und damit zu einer verminderten Testosteronsynthese führen kann; als weitere Symptome sind eine Hodenhypoplasie sowie eine reduzierte Spermienanzahl auszumachen (Kohn, 2004; Kumar et al., 2010). Nachdem in Gewebeschnitten des Hodens von TRPM5-defizienten Männchen aber keine morphologischen Auffälligkeiten bezüglich der *Tubuli seminiferi* und der Leydig Zellen erkannt und anhand der

bestimmten Hodengewichte bzw. Anzahl der Spermien auch keine drastische Unterentwicklung festgestellt wurden, kann der hypergonadotrope Hypogonadismus als Ursache für den Testosteronmangel in TRPM5-*knockout*-Männchen vorerst ausgeschlossen werden.

Der sekundäre Hypogonadismus wird durch eine Störung der Hypophyse und dadurch der Freisetzung der Releasing-Hormone LH und FSH verursacht (Seftel, 2005). Die meisten Varianten dieser Störung (Hyperprolaktinämie, isolierter FSH-Mangel) haben eine Unfruchtbarkeit zur Folge, die jedoch in TRPM5-defizienten Männchen nicht festzustellen war (Abbildung 26). Davon ausgenommen ist der isolierte LH-Mangel, der zu einer Testosteronreduktion und daraus resultierend zu einer ausbleibenden Virilisierung der Männchen führt, wobei für die Spermatogenese noch genug Testosteron vorhanden ist (Kohn, 2004). Während in TRPM5-*knockout*-Männchen die geringe Plasma-Testosteronkonzentration bei unauffälliger Spermienanzahl nachzuweisen ist, konnte eine ausbleibende Vermännlichung (z. B. fehlende Ausreifung der Hodengröße) nicht festgestellt werden.

Eine weitere Variante ist der tertiäre Hypogonadismus, bei dem eine Störung des Hypothalamus vorliegt, durch die bedingt keine pulsatile GnRH-Freisetzung stattfindet und ein hypogonadotroper Hypogonadismus entsteht (Kohn, 2004). Unter dieser Störung sind im Menschen Erkrankungen wie das Prader-Willi-Syndrom bekannt, das durch eine Schädigung des Chromosom 15 verursacht wird und von Adipositas und einer mentalen Retardierung ab Kindesalter an begleitet wird (Crinò et al., 2003). Da beide Begleiterscheinungen nicht bei TRPM5-defizienten Männchen beobachtet wurden, wird dieses Syndrom als Ursache für den Testosteronmangel in ebendiesen Männchen ebenfalls ausgeschlossen.

Die Idee dieser Arbeit, dass ein chemosensorisches System Einfluss auf den Reproduktionserfolg hat, wird von dem Kallmann- bzw. olfaktogenitalen Syndrom unterstützt, in dem klar ein verminderter olfaktorischer Sinn mit einer Reproduktionsstörung in Verbindung steht. Dieses Syndrom ist in Bezug auf den TRPM5 sehr interessant, da es durch eine Anosmie (Geruchsstörung) aufgrund einer gestörten Entwicklung des *Bulbus olfactorius* und hypothalamischer Gebiete charakterisiert ist (Dodé and Hardelin, 2009; Forni and Wray, 2015; Kohn, 2004). Während der Embryonalentwicklung bilden sich GnRH-ausschüttende Zellen aus Vorläuferzellen der olfaktorischen Plakode und wandern in das Vorderhirn ein, in dem der Hypothalamus und die Hypophyse situiert sind (Forni and Wray, 2015; Wray, 2002; Wray et al., 1989), die über die Ausschüttung der Hormone GnRH bzw. FSH und LH unter anderem die männliche Fertilität steuern. Untersuchungen zeigen, dass der TRPM5-Ionenkanal in olfaktorischen Sinnesneuronen (Kaske et al., 2007), im olfaktorischen Bulbus (Lin et al., 2007; Rolin et al., 2014) und sogar in der hypothalamischen Struktur, der *Eminentia mediana*, exprimiert wird (mündliche Korrespondenz mit Prof. Böhm, Universitätsklinikum des Saarlandes; Daten nicht veröffentlicht). Die *Eminentia mediana* ist die Schnittstelle zwischen der neuronalen und endokrinen hypothalamisch-hypophysären Regulation der Reproduktion (Yin and Gore, 2010). Obwohl die Leitsymptome des Kallmann-Syndroms (z. B. Hodenhypoplasie, Infertilität, Mikrophallus, Kryptorchismus, Nierenfehlbildungen) in TRPM5-*knockout*-Männchen nicht beobachtet, bzw. bisher nicht untersucht (Mikrophallus, Kryptorchismus, Nierenfehlbildungen) wurden, sind weiterführende Studien bezüglich der GnRH- bzw. FSH- und LH-Konzentration von großem Interesse, da in TRPM5-*knockout*-Männchen eine milde Form dieses Syndroms vorliegen könnte. In diesem Zusammenhang ist auch die hormonelle Untersuchung der TasR-TRPM5-Doppel-*knockout*-Männchen von Bedeutung für die weitere Charakterisierung des Reproduktionsphänotyps dieser Mauslinien, da die reduzierte epididymale Spermienanzahl in

den Tas1r1-TRPM5-Doppel-*knockout*-Männchen endokrin verursacht sein könnte und auch auf eine Hypogonadismus-Variante hindeuten könnte.

Neben dem männlichen Reproduktionsgewebe ergaben erste Arbeiten, dass die Geschmacksrezeptoren Tas1r1 und Tas2r131 (Voigt et al., 2015) sowie der Ionenkanal TRPM5 (mündliche Korrespondenz mit Prof. Böhm, Universitätsklinikum des Saarlandes; Daten nicht veröffentlicht) auch im Gehirn exprimiert werden. Daher wäre eine genaue Expressionsanalyse der gustatorischen Signalproteine auch für das Gehirn wichtig, da die beobachteten Fertilitäts-Einschränkungen der Tas1r1-TRPM5- bzw. Tas2r131-TRPM5-Doppel-*knockout* Männchen nicht nur auf Ebene der Reproduktionsorgane verursacht sein könnten. Zusätzlich wären Fehlfunktionen, die auf einen neuroendokrinen Einfluss des Tas1r1, Tas2r131 und/oder TRPM5 auf die Fertilität hindeuten, und dadurch die Reproduktionsfähigkeit bereits auf einer der ersten Ebenen der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (Abbildung 1) einschränken könnten, denkbar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei einem Vergleich der Reproduktionsparameter der beiden TasR-TRPM5-Doppel-*knockout* Mauslinien die gemeinsame Deletion des Tas1r1 und des TRPM5 insgesamt einen größeren Einfluss auf die Reproduktionsfähigkeit der Männchen hat, als das Fehlen des Tas2r131 zusammen mit dem TRPM5. Analysen der Tas1r1-TRPM5-Doppel-*knockout*-Zuchtpaare/Männchen zeigen einen zeitlich signifikant verlängerten Abstand zwischen zwei Würfen, eine höhere postnatale Mortalitätsrate, eine signifikant erhöhte testikuläre Apoptoserate, eine leicht verringerte Anzahl an epididymalen Spermien sowie eine signifikant voluminösere Kopfmorphologie. Da Tas2r131-TRPM5-Doppel-*knockout*-Männchen und TRPM5-*knockout*-Männchen auch eine erhöhte Sterberate unter den Jungtieren, eine erhöhte Apoptoserate in den *Tubuli seminiferi* und eine Volumenzunahme der Spermienköpfe zeigten, könnte die Ursache hierfür möglicherweise in dem Fehlen des TRPM5-Ionenkanals liegen. Da der verlängerte Wurfabstand und die etwas reduzierte Spermienanzahl nicht in Tas2r131-TRPM5-Doppel-*knockout*- bzw. TRPM5-*knockout*-Männchen zu registrieren sind, ist hierbei von einem distinkten Einfluss des Tas1r1 gemeinsam mit dem TRPM5 auf die entsprechenden Parameter auszugehen. Die verschiedenartige Ausprägungsstärke der beiden Tas1r1-TRPM5- und Tas2r131-TRPM5-Doppel-*knockout*-Phänotypen kann durch die unterschiedlich großen Tas1- bzw. Tas2-Geschmacksrezeptorfamilien hervorgerufen werden, die in der Tas2r131-TRPM5-Doppel-*knockout*-Mauslinie eine scheinbar vollständige Kompensation des Bitterrezeptors durch einen anderen Tas2-Rezeptor erlauben. Dieser Bitterrezeptor-Ausgleich könnte jedoch auch der Grund dafür sein, dass keinerlei Tas2r131-TRPM5-spezifische Auswirkungen mehr auffallend sind, während eine mögliche Kompensation des Tas1r1 durch den Tas1r3 nicht ausreichend genug scheint und deshalb vereinzelte Besonderheiten in der Tas1r1-TRPM5-Doppel-*knockout*-Mauslinie auftreten.

5.2 Expression von MUPP1 und OMP in extranasalen Organsystemen

5.2.1 MUPP1 in gustatorischen und gastrointestinalen Zellen

Das an der olfaktorischen Signalweiterleitung beteiligte Protein MUPP1 ist aus 13 Proteininteraktionsdomänen aufgebaut (Ullmer et al., 1998). Ähnlich dem InaD (engl.: *inactivation no afterpotential D*) aus dem Sehsystem von *Drosophila melanogaster*, wird auch für das MUPP1 eine Funktion als Proteinkomplex („Olfactosome“)-Bildner diskutiert (Baumgart et al., 2014). Daher wird angenommen, dass MUPP1 unterschiedliche Signaltransduktionskomponenten bindet und in räumliche Nähe zueinander bringt, wodurch eine schnelle und störungsfreie Weiterleitung eines Reizes gewährleistet wäre (Dooley et al., 2009). Erste Untersuchungen dazu haben bereits gezeigt, dass MUPP1 diverse Proteine der olfaktorischen Signalkaskade bindet (Baumgart et al., 2014), und dass ohne ein funktionelles MUPP1 olfaktorische Desensibilisierungsprozesse durch lang anhaltende Ca^{2+} -Ströme verzögert werden (Dooley et al., 2009). Auch für das gustatorische System wurde bereits eine MUPP1-Expression in Zellen der Wallpapille gezeigt (Liu et al., 2012b). Daher wurden im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit histologische Koloalisationsstudien durchgeführt, um so zu überprüfen, ob MUPP1 auch mit Proteinen der gustatorischen Signalkaskade koloalisiert ist, so dass die Proteinkomplex-Hypothese dann auch auf das Geschmackssystem übertragen werden könnte.

In diesen Studien zeigte sich, dass MUPP1 sowohl in jeder Tas2r131-exprimierenden als auch in allen TRPM5-exprimierenden Zellen einer Geschmacksknospe nachzuweisen ist (Abbildung 39). Aufgrund der charakteristischen Markierung der gustatorischen Typ II-Zellen durch den TRPM5 und der MUPP1-Expression in exakt den gleichen Zellen, erscheint die Beteiligung des MUPP1 an der gustatorischen Signaltransduktion möglich. Ähnlich den Untersuchungen am olfaktorischen System sind deshalb Analysen zur Reizweiterleitung notwendig, um so feststellen zu können, ob MUPP1-*knockout*-Mäuse ein verändertes Rezeptorpotential zeigen. Eine verlängerte gustatorische elektrische Antwort auf einen Geschmacksstoff in MUPP1-defizienten Zellen könnte dann drauf hindeuten, dass MUPP1, unabhängig vom chemosensorischen System, als Multiproteinadapter fungiert und dadurch Einfluss auf die Wahrnehmung einer Maus hat.

Der TRPM5-Ionenkanal wird nicht nur im Geruchs- und Geschmackssystem, sondern gemeinsam mit weiteren gustatorischen Proteinen, auch im Gastrointestinaltrakt exprimiert (Eberle et al., 2013; Kaske et al., 2007). Während der TRPM5 im murinen Magen in Zellen des Corpus, der „*limiting ridge*“ und des Pylorus nachgewiesen werden kann, konnte MUPP1 mit Hilfe histologischer Immunfluoreszenz-Analysen nur im Bereich der „*limiting ridge*“ und in Pylorusdrüsen nachgewiesen werden (Abbildung 40). Da in diesen Bereichen MUPP1 mit dem TRPM5 in den gleichen Zellen koloalisiert vorliegt, kann auch hier eine mögliche Beteiligung des MUPP1 an einer chemosensorischen Signalweiterleitung postuliert werden. Während diverse Studien über die Beteiligung chemosensorischer Proteine an der hormonellen Regulation des Verdauungsapparates existieren (Finger and Kinnamon, 2011; Rozengurt and Sternini, 2007), ist nicht klar, warum MUPP1 ausschließlich in Zellen der „*limiting ridge*“ und des Pylorus exprimiert wird und nicht auch im Corpus-Areal, in dem die hormonelle Sekretion von Verdauungsenzymen stattfindet (Greeley, 1998). Nachdem die faltige Struktur der „*limiting ridge*“ den Ösophagus-Ausgang umschließt, und der Pylorus den Übergang des Magens in den Dünndarm darstellt, könnte an beiden Ein- und Ausgangsstellen des Magens eine toxikologische Kontrolle der aufgenommenen Nahrung stattfinden. Eine derartige Prüfung muss schnelle Reaktionen zur Folge haben, so dass eine Signaltransduktion durch einen MUPP1-vermittelten

Multiproteinkomplex eine effiziente Strategie darstellen würde, um die weitere Aufnahme verdorbener und/oder giftiger Nahrungsbestandteile zu verhindern bzw. ihr rasch entgegenzuwirken. Um dieser Hypothese jedoch zu überprüfen, wären auch hier weitere immunhistochemische Untersuchungen sowie Interaktionsstudien notwendig.

5.2.2 OMP- ein olfaktorisches Protein in der Lunge

Die Lunge ist eines der wenigen inneren Organe, das direkt mit dem äußeren Umfeld eines Organismus in Kontakt kommt. Daher ist es wichtig, dass die Lunge potentielle Gefahren schnell bemerkt und sich durch geeignete Mechanismen vor äußeren schädlichen Einflüssen schützt. Bereits in zahlreichen wissenschaftlichen Studien konnte gezeigt werden, dass sich chemosensorische Proteine auch im oberen und unterem respiratorischen System befinden, und dass diese an Reaktionen auf äußere Einflüsse (z. B. Husten, Erhöhung der ziliären Aktivität um schädliche Substanzen abzutransportieren) (Deshpande et al., 2010; Shah et al., 2009; Tizzano et al., 2011; Tizzano et al., 2010) beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das olfaktorische Protein (OMP) im Alveolargewebe der Lunge exprimiert wird und dort mit chemosensorischen Proteinen des olfaktorischen- (ACIII) und des gustatorischen Systems (TRPM5) colokalisiert erscheint (Abbildung 45 und Abbildung 48). Da der TRPM5-Ionenkanal auch im olfaktorischen System eine funktionelle Rolle spielt (Lin et al., 2008; Lin et al., 2007; Lopez et al., 2014), könnte die colokalisierte, alveolare Expression von OMP mit ACIII bzw. TRPM5 auch ein Hinweis darauf sein, dass OMP, ähnlich wie MUPP1, System-unabhängig mit unterschiedlichen chemosensorischen Proteinen agiert. Inwiefern dieses Zusammenspiel erfolgt, kann anhand der hier präsentierten immunhistologischen Ergebnisse nicht beantwortet werden, sondern benötigt weiterführende Interaktionsstudien von OMP mit ACIII und TRPM5 in Lungengewebe.

Im Alveolargewebe der Lunge formen die beiden Zelltypen der AT I- und II-Zellen eine funktionelle Barriere, um vor eingeatmeten Partikeln zu schützen und sogar eine immunologische Reaktion auszulösen (Chen et al., 2006; Chuquimia et al., 2013). Obwohl eine noch ausstehende Analyse mit Zellmarkern für beide Pneumozyten-Zelltypen Aufschluss darüber geben würde, ob OMP tatsächlich in einem der beiden Zelltypen exprimiert wird, kann anhand des morphologischen Erscheinungsbildes (Abbildung 43) bereits angenommen werden, dass OMP in AT II-Zellen exprimiert wird, die an ihrer kubischen Form zu erkennen sind (Chuquimia et al., 2013). Neben den Pneumozyten wirken auch Alveolarmakrophagen an der immunologischen Verteidigung des respiratorischen Systems mit. Makrophagen sind Zellen des Immunsystems und können über den Prozess der Phagozytose gefährliche Mikroorganismen unschädlich machen (Chuquimia et al., 2013). Sie entstehen im Knochenmark und können über den Blutstrom in das Lungengewebe gelangen, wo sie zu Alveolarmakrophagen differenzieren. Makrophagen sind große Zellen mit einem deutlichen Zellkern und einem ausgeprägten Zytoplasma, aus dem Ausläufer gebildet werden können, mit Hilfe derer sich die Zelle innerhalb des Gewebes fortbewegen kann (Campbell et al., 2006; Lohmann-Matthes et al., 1994). Anhand der gezeigten Aufnahme in Abbildung 43 ist ein deutlicher zellulärer Unterschied zwischen der OMP-Expression in beiden präsentierten Aufnahmen zu erkennen. Während in Abbildung 43 B die Zelle aufgrund ihrer kubischen Form einer AT II-Zelle gleicht, wirkt die OMP-positive Zelle in Abbildung 43 C deutlich größer, mit einem großen runden Zellkern und einem ausgeprägten

Zytoplasma, das Zellausläufer zu bilden scheint. Diese morphologischen Merkmale deuten auf eine Alveolarmakrophage hin, so dass eine Expression des OMPs in immunologischen Fresszellen der Lunge möglich erscheint. Initiale quantitative RT-PCR (qPCR) Analysen mit OMP-spezifischen Primern zeigten in murinen Makrophagen des Knochenmarks Signale der OMP-mRNA (Daten nicht gezeigt). Um den Hinweisen der OMP-Expression in alveolaren Immunzellen weiterhin nachgehen zu können, sind fortführende qPCR-Analysen mit OMP-Primern und murinen Makrophagen sowie immunhistochemische Colokalisationstudien mit Makrophagenmarkern (z. B. Iba-1) (Ohsawa et al., 2004) notwendig.

In vorangegangenen wissenschaftlichen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass Geruchs- und Geschmacksrezeptoren an der Aktivierung der pulmonalen Immunantwort beteiligt sind (Deshpande et al., 2010; Shah et al., 2009), und dass ORs in Alveolarmakrophagen exprimiert werden (Li et al., 2013). Diese Vielfalt an Rezeptoren macht es den Makrophagen möglich, auf diverse Stimuli zu reagieren, wobei sie zugleich die Differenzierung, Aktivierung, Migration und Phagozytose der Makrophagen reguliert (Li et al., 2013). Obwohl dem OMP, das auch extranasal in Zellen mit weiteren Geruchs-assoziierten Proteinen nachgewiesen wurde (Kang et al., 2015), bisher keine eindeutige Funktion innerhalb der olfaktorischen Signalkaskade zugeordnet werden kann, erscheint eine Beteiligung des ektopen OMPs an der Signaltransduktion der pulmonalen Immunantwort aufgrund der bereits publizierten Erkenntnisse und der hier präsentierten Ergebnisse denkbar.

Da die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur Expression des Gerüstproteins MUPP1 und OMP in weiteren als den bisher bekannten Systemen noch keine eindeutigen Aussagen darüber zulassen, ob MUPP1 und OMP sowohl gustatorische, als auch olfaktorische Signalproteine binden, sind hierfür unbedingt weiterführende Analysen zur Klärung notwendig. Es kann jedoch klar festgehalten werden, dass sowohl MUPP1 als auch OMP gemeinsam mit dem TRPM5 und weiteren chemosensorischen Signalproteinen in einer Zelle exprimiert werden, und dass für das OMP sogar Hinweise auf einen immunologischen Zusammenhang mit der chemosensorischen Signalkaskade erbracht werden konnten.

5.3 Ausblick

5.3.1 Funktioneller Einfluss gustatorischer Signalproteine auf Vorgänge der männlichen Reproduktion

Obwohl der biologische Vorgang der sexuellen Reproduktion einer der fundamentalsten Prozesse zur Erhaltung der Art ist, kann noch nicht jede fertilitätsrelevante molekulare Reaktion detailliert erklärt werden. Abgesehen von der Motivation der Grundlagenforschung, den gesamten Prozess (Spermatogenese, Kapazitierung, Wegfindung zur Eizelle, Akrosomreaktion uvm.) mit seinen Details zu verstehen, herrscht auch ein besonders großes medizinisches (Fruchtbarkeitsstörungen) und soziales (Verhütungsmittel) Interesse an möglichen therapeutischen Maßnahmen, reproduktive Vorgänge zu beeinflussen. Anhand wissenschaftlicher Arbeiten der letzten Dekade wurde eine bis *dato* auf das Geschmackssystem beschränkte Expression gustatorischer Signalproteine auch im männlichen Reproduktionsgewebe gezeigt und ihr Einfluss auf das Fruchtbarkeitspotential näher untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Versuchsansätze gewählt, um die Funktion gustatorischer Proteine in Prozessen der männlichen Reproduktionsorgane genauer zu charakterisieren.

Der Bitterrezeptor Tas2r131, dessen mRNA besonders stark im männlichen Hodengewebe nachgewiesen werden konnte, scheint eine besondere, allerdings noch nicht geklärte Funktion im männlichen Reproduktionsgewebe zu haben. In Analysen zur Vererbung der genetischen Information der manipulierten codierenden Tas2r131-Sequenz in geschlechtsspezifischen Verpaarungen der Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}-Mauslinie konnte festgestellt werden, dass, unabhängig vom genetischen Stammbaum, die veränderte Gensequenz im Männchen vermehrt geschlechtsunabhängig vererbt wird. Weiterführende Chromosomenanalysen könnten Aufschluss darüber geben, ob während der Meiose im Verlauf der Spermatogenese genetische Dysfunktionen auftreten. Diese könnten chromosomale Aberrationen hervorrufen und so möglicherweise eine fehlerhafte Segregation der Keimzellen herbeiführen, die das verstärkte Vererbungsmuster des Tas2r131-hrGFPs erklären könnte. Diesbezüglich wurde in ersten Untersuchungen von Tas2r131 [-]-Spermien eine erhöhte Induktion der Akrosomreaktion in Folge einer Inkubation mit muriner *Zona pellucida* festgestellt. Dadurch könnten Spermien ohne einen funktionellen Tas2r131-Bitterrezeptor einen selektiven Vorteil bezüglich der Eizellbefruchtung haben. Aufgrund der geringen Anzahl analysierter Spermienproben wären daher zusätzliche Analysen zur Reaktivität Tas2r131-defizienter Spermien auf isolierte und solubilisierete *Zona pellucida* notwendig.

Um zu überprüfen, ob der milde Reproduktionsphänotyp von Tas2r131-defizienten Männchen möglicherweise durch eine kompensatorische Hochregulation eines oder mehrerer Mitglieder der Tas2-Rezeptorfamilie zu erklären ist, könnte mit Hilfe quantitativer RT-PCR Analysen gezeigt werden, ob in Tas2r131-defizienten Männchen ein höheres mRNA-Expressionslevel eines anderen Vertreters der Bitterrezeptorfamilie nachzuweisen ist, als in Wildtyp-Männchen.

Neben den Tas2r131-*knockout*-Mäusen wurden auch TRPM5-defiziente Männchen bezüglich ihrer Fertilität und dem Reproduktionsverhalten genauer untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass in Zuchtpaaren von TRPM5-*knockout*-Mäusen (später auch von TasR-TRPM5-Doppel-*knockout*-Mäusen) eine vermehrte postnatale Mortalitätsrate zu registrieren war. Da der TRPM5-Ionenkanal an der Detektion von olfaktorischen Stimuli beteiligt ist, die die innerartliche Kommunikation ermöglicht, könnte eine fehlende mütterliche Fürsorge aufgrund einer

eingeschränkten Wahrnehmung von ausgesendeten Geruchsreizen durch die Jungtiere der Grund für die erhöhte Sterblichkeitsrate sein. Um dies näher zu untersuchen, sind maternale Verhaltenstests *postpartum* sowie olfaktorische Verhaltensanalysen nötig.

In funktionellen Untersuchungen wurde in kapazitierten TRPM5 [-]-Spermien ein erhöhtes Ca^{2+} -Basallevel festgestellt. Da zusätzlich in testikulären TRPM5-*knockout*-Gewebeschnitten (und auch in Gewebeschnitten von TasR-TRPM5-Doppel-*knockout*-Hoden) eine angestiegene Rate apoptotischer Zellen zu verzeichnen war, könnten quantitative ROS-Bestimmungen Klarheit darüber verschaffen, ob die Deletion der TRPM5-codierenden Sequenz zu einer Veränderung der Ca^{2+} -Homöostase führt, die erhebliche Zellschäden als Folge hätte. Gleichzeitig sind aufgrund der veränderten Ca^{2+} -Konzentration Motilitätsmessungen von TRPM5-*knockout*- (und TasR-TRPM5-Doppel-*knockout*)-Spermien wichtig, um weitere Aussagen bezüglich der Fertilität treffen zu können. Da jedoch die Ursache der erhöhten Ca^{2+} -Konzentration nicht bekannt ist, sind auch elektrophysiologische Messungen notwendig, die zeigen sollen, ob in TRPM5 [-]-Spermien eine verlängerte Hyperpolarisation nachzuweisen ist. Eine solche Veränderung könnte in TRPM5 [-]-Spermien einen erhöhten Ca^{2+} -Influx verursachen.

Da neben einem reibungslosen, funktionellen Ablauf auch die hormonelle Regulation einen essentiellen Einfluss auf die Fertilitätsrate hat, wurde in initialen Messungen die Konzentration des Steroidhormons Testosteron in TRPM5-*knockout*-Männchen bestimmt. Die dabei gemessene, signifikante Testosteron-Reduktion deutet auf eine Beteiligung des TRPM5-Ionenkanals an der Synthese, Ausschüttung oder der vermehrten Metabolisierung des Hormons hin. Da in den Leydig Zellen die Testosteron-Synthese und -sekretion stattfindet, und in den Leydig Zellen die Expression des TRPM5 beobachtet wurde, jedoch noch nicht in Colokalisationsstudien mit Leydig-Zellmarkern bestätigt wurden, sind weitere histologische Untersuchungen dieser Zellen unerlässlich. Interessant wäre hierbei, ob sich aufgrund der TRPM5-Deletion die Anzahl der Leydig Zellen verändert oder die Morphologie andersartig erscheint. Eine zusätzliche Konzentrationsmessung des *Insulin-like factor 3* (INSL3), einem Leydig Zell-sekretierten Peptidhormon, wäre sicherlich auch ein hilfreicher Parameter zur Bestimmung der Leydig Zell-Funktionalität (Ivell et al., 2013), da dessen Quantifizierung Rückschlüsse über die Testosteronsekretion zulassen würde. Für die weitere Charakterisierung des TRPM5 in Bezug auf seine Funktion im männlichen Reproduktionssystem sind zusätzliche hormonelle Analysen (GnRH, FSH, LH) auch in TasR-TRPM5-Doppel-*knockout*-Männchen unverzichtbar. Anhand dieser Untersuchungen könnte anschließend geschlussfolgert werden ob, und wenn auf welcher Ebene, der TRPM5 Einfluss auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse ausübt.

Obwohl das gemeinsame Fehlen der gustatorischen Signalproteine Tas1r1, Tas2r131 und TRPM5, die auch im männlichen Reproduktionsgewebe exprimiert werden, in den Tas1r1-TRPM5- und Tas2r131-TRPM5-Doppel-*knockout*-Mauslinien keinen gravierenden Reproduktionsphänotyp zeigt, sind in Tas1r1-TRPM5-Doppel-*knockout*-Tieren gehäuft Auffälligkeiten im Vergleich zur Wildtyp-Mauslinie C57BL/6N zu registrieren. Die hier vorgestellten Befunde zeigen unter anderem, dass in Tas1r1-TRPM5-Doppel-*knockout*-Zuchtpaaren ein verlängerter Abstand zwischen einzelnen Würfen registriert wurde. Da in Männchen dieser Mauslinie zusätzlich eine verringerte Anzahl an Spermien festzustellen war, könnte diese Fertilitätseinschränkung der Grund für die größeren zeitlichen Abstände zwischen zwei Würfen sein. Um jedoch herauszufinden, ob die Ursache für diese Zuchtabweichung tatsächlich in einer verringerten männlichen Fertilität oder aber in einer verlängerten Tragezeit

liegt, könnten vaginale Plug-Analysen durchgeführt werden, die erste Hinweise darauf geben würden, ob und wie oft eine Kopulation der Zuchttiere stattfindet und wie häufig daraus eine Schwangerschaft resultiert.

Aufgrund der veränderten Konzentration des *second messengers* Ca^{2+} in Spermien von TRPM5-*knockout* Männchen wäre es äußerst interessant, diesen Punkt auch für die hier generierten TasR-TRPM5-Doppel-*knockout* Spermien zu klären. Da in Tas1r3- α -Gustducin-Doppel-*knockout*-Männchen eine reduzierte testikuläre Expression von Genen, die durch den Transkriptionsfaktor CREM (engl.: *cAMP response element modulator*) reguliert werden, festgestellt wurde (Mosinger et al., 2013), wären zusätzliche Konzentrationsbestimmungen des kleinen Signalmoleküls cAMP in TRPM5-*knockout* und/oder TasR-TRPM5-Doppel-*knockout* Spermien ebenso spannend.

Zur Analyse, warum die hier untersuchten Doppel-*knockout*-Tiere keine derart schwerwiegenden Einbußen bezüglich ihrer Fertilität haben, wie es für die Tas1r3- α -Gustducin-Doppel-*knockout*-Männchen beobachtet wurde, könnten qPCR Analysen angewendet werden. Mit Hilfe dieser wäre es möglich festzustellen, ob beispielsweise in Tas1r1-TRPM5-Doppel-*knockout*-Männchen die Expression des Tas1r3 hochreguliert ist. Da der Tas1r3 im gustatorischen System ein essentieller Geschmacksrezeptor für den Süß- und Umami-Geschmack ist, könnten anschließende Zuchtversuche mit Tas1r3-TRPM5-Doppel-*knockout*-Mäusen zeigen, ob in diesen Männchen auch ein eher milder Reproduktionsphänotyp festgestellt werden kann; oder ob die Männchen, ähnlich den Tas1r3- α -Gustducin-Doppel-*knockout*-Männchen, ebenfalls steril sind. Diese Befunde würden zum einen weitere Hinweise darüber liefern, ob eine gustatorische Signalkaskade auch im männlichen Reproduktionstrakt funktionell aktiv ist; zum anderen könnte dadurch gezeigt werden, ob ausschließlich eine funktionelle Interaktion des Tas1r3 mit α -Gustducin wichtig für die männliche Fertilität ist, oder ob auch eine Tas1r3-vermittelte Signalweiterleitung über den TRPM5 Ionenkanal essentiell ist.

5.3.2 MUPP1 und OMP als mögliche Multiproteinadaptoren in unterschiedlichen chemosensorischen Organsystemen

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Zuhilfenahme immunhistologischer Kolo-kalisationstudien gezeigt, dass MUPP1 gemeinsam mit Vertretern der gustatorischen Signalkaskade in Typ II-Zellen bzw. in Zellen der „*limiting ridge*“ und der Pylorusdrüsen des murinen Magens exprimiert wird. Für die exakte Bestimmung der MUPP1-Lokalisation in den Rezeptorzellen einer Geschmacksknospe und in chemosensorisch aktiven Zellen des Gastrointestinaltrakts sind fortführende Untersuchungen mit Typ II-Zellmarkern (z. B. PLC β 2) bzw. Zellmarkern für Zellen des Pylorus (z. B. G-Zellen – Gastrin) notwendig. Durch Interaktionsstudien mit MUPP1 und Proteinen der gustatorischen Signalkaskade könnten nicht nur Protein-Bindepartner identifiziert werden, sondern auch Hinweise gesammelt werden, die auf eine mögliche Funktion des MUPP1 auch außerhalb des bisher untersuchten Systems schließen lassen. Auf diese Weise könnte eindeutig gezeigt werden, ob MUPP1 ein oder mehrere Signalproteine bindet und dadurch Einfluss auf den Ablauf der Signaltransduktion ausüben könnte.

Anhand immunohistochemischer Studien konnte in dieser Arbeit die Expression des Proteins OMP, das einen Marker für olfaktorische Sinnesneurone darstellt, in Lungengewebe

nachgewiesen werden. Untersuchungen mit mehreren olfaktorischen und gustatorischen Signalproteinen ließen außerdem erkennen, dass OMP gemeinsam mit ACIII und TRPM5 in Zellen des Alveolargewebes exprimiert wird. Weiterführende histologische Analysen mit spezifischen Lungen-Zellmarkern könnten Aufschluss über den exakten Zelltyp geben, in dem das OMP gezeigt wurde, so dass dadurch auf eine mögliche Funktion des OMPs in der Lunge geschlossen werden könnte. Nachdem OMP außerdem in Alveolarmakrophagen-ähnlichen Zellen nachgewiesen wurde und zusätzlich initiale qPCR Analysen auf eine OMP-Expression in murinen Makrophagen hindeuten, sind weitere Analysen mit einem Makrophagenmarker (Iba-1) und fortführende qPCR Analysen notwendig, um diesen Befund zu bestätigen. Zusätzliche Studien über die Migration, Phagozytose und Morphologie von OMP-defizienten Makrophagen könnten dann Aufschluss darüber geben, ob OMP einen möglichen Einfluss auf eine immunologische Reaktion hat.

Literaturverzeichnis

- Ackermann, F., N. Zittronski, D. Heydecke, B. Wilhelm, T. Gudermann, and I. Boekhoff. 2008. The Multi-PDZ domain protein MUPP1 as a lipid raft-associated scaffolding protein controlling the acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *J Cell Physiol.* 214:757-768.
- Adler, E., M.A. Hoon, K.L. Mueller, J. Chandrashekar, N.J. Ryba, and C.S. Zuker. 2000. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell.* 100:693-702.
- Aitken, R.J., and M.A. Baker. 2008. The role of proteomics in understanding sperm cell biology. *Int J Androl.* 31:295-302.
- Akimori, T., K. Hanazaki, T. Okabayashi, K. Okamoto, M. Kobayashi, and T. Ogata. 2011. Quantitative distribution of brush cells in the rat gastrointestinal tract: brush cell population coincides with NaHCO₃ secretion. *Med Mol Morphol.* 44:7-14.
- Anawalt, B.D. 2013. Approach to male infertility and induction of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 98:3532-3542.
- Aparicio, J.M., J. Ortego, G. Calabuig, and P.J. Cordero. 2010. Evidence of subtle departures from Mendelian segregation in a wild lesser kestrel (*Falco naumanni*) population. *Heredity.* 105:213-219.
- Arndt, L., J. Castonguay, E. Arlt, D. Meyer, S. Hassan, H. Borth, S. Zierler, G. Wennemuth, A. Breit, M. Biel, C. Wahl-Schott, T. Gudermann, N. Klugbauer, and I. Boekhoff. 2014. NAADP and the two-pore channel protein 1 participate in the acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Mol Biol Cell.* 25:948-964.
- Arnoult, C., I.G. Kazam, P.E. Visconti, G.S. Kopf, M. Villaz, and H.M. Florman. 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:6757-6762.
- Avidan, N., H. Tamary, O. Dgany, D. Cattani, A. Pariente, M. Thulliez, N. Borot, L. Moati, A. Barthelme, L. Shalmon, T. Krasnov, E. Ben-Asher, T. Olender, M. Khen, I. Yaniv, R. Zaizov, H. Shalev, J. Delaunay, M. Fellous, D. Lancet, and J.S. Beckmann. 2003. CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur J Hum Genet.* 11:497-502.
- Aviles, M., M.T. Castells, J.A. Martinez-Menarguez, I. Abascal, and J. Ballesta. 1997. Localization of penultimate carbohydrate residues in zona pellucida and acrosomes by means of lectin cytochemistry and enzymatic treatments. *Histochem J.* 29:583-592.
- Avwioro, G. 2011. Histochemical uses of haematoxylin—a review. *JPCS.* 1:24-34.
- Babcock, D.F., and D.R. Pfeiffer. 1987. Independent elevation of cytosolic [Ca²⁺] and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms. *J Biol Chem.* 262:15041-15047.
- Bagasra, O., S.P. Hauptman, H.W. Lischner, M. Sachs, and R.J. Pomerantz. 1992. Detection of human immunodeficiency virus type 1 provirus in mononuclear cells by in situ polymerase chain reaction. *The New England journal of medicine.* 326:1385-1391.
- Bagatell, C.J., K.D. Dahl, and W.J. Bremner. 1994. The direct pituitary effect of testosterone to inhibit gonadotropin secretion in men is partially mediated by aromatization to estradiol. *J Androl.* 15:15-21.
- Bahat, A., and M. Eisenbach. 2006. Sperm thermotaxis. *Mol Cell Endocrinol.* 252:115-119.
- Bahat, A., and M. Eisenbach. 2010. Human sperm thermotaxis is mediated by phospholipase C and inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ channel. *Biol Reprod.* 82:606-616.
- Bahat, A., M. Eisenbach, and I. Tur-Kaspa. 2005. Periovalutary increase in temperature difference within the rabbit oviduct. *Hum Reprod.* 20:2118-2121.

- Bahat, A., I. Tur-Kaspa, A. Gakamsky, L.C. Giojalas, H. Breitbart, and M. Eisenbach. 2003. Thermotaxis of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nat Med.* 2003 Feb;9(2):149-50.
- Baillie, H.S., A.A. Pacey, M.A. Warren, I.W. Scudamore, and C.L. Barratt. 1997. Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla. *Hum Reprod.* 12:1985-1992.
- Baldi, E., R. Casano, C. Falsetti, C. Krausz, M. Maggi, and G. Forti. 1991. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl.* 12:323-330.
- Baldisseri, D.M., J.W. Margolis, D.J. Weber, J.H. Koo, and F.L. Margolis. 2002. Olfactory marker protein (OMP) exhibits a beta-clam fold in solution: implications for target peptide interaction and olfactory signal transduction. *J Mol Biol.* 319:823-837.
- Battalia, D.E., and R. Yanagimachi. 1979. Enhanced and co-ordinated movement of the hamster oviduct during the periovulatory period. *J Reprod Fertil.* 56:515-520.
- Baumgart, S., F. Jansen, W. Bintig, B. Kalbe, C. Herrmann, F. Klumpers, S.D. Koster, P. Scholz, S. Rasche, R. Dooley, N. Metzler-Nolte, M. Spehr, H. Hatt, and E.M. Neuhaus. 2014. The scaffold protein MUPP1 regulates odorant-mediated signaling in olfactory sensory neurons. *J Cell Sci.* 127:2518-2527.
- Behrens, M., S. Foerster, F. Staehler, J.D. Raguse, and W. Meyerhof. 2007. Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogeneous population of bitter responsive taste receptor cells. *J Neurosci.* 27:12630-12640.
- Behrens, M., J.W. Margolis, and F.L. Margolis. 2003. Identification of members of the Bex gene family as olfactory marker protein (OMP) binding partners. *J Neurochem.* 86:1289-1296.
- Behrens, M., and W. Meyerhof. 2006. Bitter taste receptors and human bitter taste perception. *Cell Mol Life Sci.* 63:1501-1509.
- Behrens, M., and W. Meyerhof. 2010. Oral and extraoral bitter taste receptors. *Results Probl Cell Differ.* 52:87-99.
- Behrens, M., W. Meyerhof, C. Hellfritsch, and T. Hofmann. 2011. Sweet and umami taste: natural products, their chemosensory targets, and beyond. *Angew Chem Int Ed Engl.* 50:2220-2242.
- Belluscio, L., G.H. Gold, A. Nemes, and R. Axel. 1998. Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron.* 20:69-81.
- Besnard, P., P. Passilly-Degrace, and N.A. Khan. 2016. Taste of Fat: A Sixth Taste Modality? *Physiol Rev.* 96:151-176.
- Bezencon, C., A. Furholz, F. Raymond, R. Mansourian, S. Metairon, J. Le Coutre, and S. Damak. 2008. Murine intestinal cells expressing Trpm5 are mostly brush cells and express markers of neuronal and inflammatory cells. *J Comp Neurol.* 509:514-525.
- Bianchi, E., B. Doe, D. Goulding, and G.J. Wright. 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature.* 508:483-487.
- Bleil, J.D., and P.M. Wassarman. 1980. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol.* 76:185-202.
- Bleil, J.D., and P.M. Wassarman. 1983. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol.* 95:317-324.
- Borowsky, B., N. Adham, K.A. Jones, R. Raddatz, R. Artymyshyn, K.L. Ogozalek, M.M. Durkin, P.P. Lakhani, J.A. Bonini, S. Pathirana, N. Boyle, X. Pu, E. Kouranova, H. Lichtblau, F.Y. Ochoa, T.A. Branchek, and C. Gerald. 2001. Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:8966-8971.
- Boryshpolets, S., S. Perez-Cerezales, and M. Eisenbach. 2015. Behavioral mechanism of human sperm in thermotaxis: a role for hyperactivation. *Hum Reprod.* 30:884-892.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72:248-254.
- Branham, M.T., M.A. Bustos, G.A. De Blas, H. Rehmann, V.E. Zarelli, C.L. Trevino, A. Darszon, L.S. Mayorga, and C.N. Tomes. 2009. Epac activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis. *J Biol Chem*. 284:24825-24839.
- Branham, M.T., L.S. Mayorga, and C.N. Tomes. 2006. Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. *J Biol Chem*. 281:8656-8666.
- Braun, T., P. Volland, L. Kunz, C. Prinz, and M. Gratzl. 2007. Enterochromaffin cells of the human gut: sensors for spices and odorants. *Gastroenterology*. 132:1890-1901.
- Breckler, M., M. Berthouze, A.C. Laurent, B. Crozatier, E. Morel, and F. Lezoualc'h. 2011. Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications. *Cell Signal*. 23:1257-1266.
- Breitbart, H. 2002a. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol*. 187:139-144.
- Breitbart, H. 2002b. Role and regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis. *J Reprod Immunol*. 53:151-159.
- Breitbart, H., and B. Spungin. 1997. The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod*. 3:195-202.
- Brenker, C., N. Goodwin, I. Weyand, N.D. Kashikar, M. Naruse, M. Krahling, A. Muller, U.B. Kaupp, and T. Strunker. 2012. The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *Embo J*. 31:1654-1665.
- Brucker, C., and G.B. Lipford. 1995. The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Human reproduction update*. 1:51-62.
- Brunet, L.J., G.H. Gold, and J. Ngai. 1996. General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron*. 17:681-693.
- Buck, L., and R. Axel. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*. 65:175-187.
- Buck, L.B. 1996. Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu Rev Neurosci*. 19:517-544.
- Buck, L.B. 2000. The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell*. 100:611-618.
- Buell, G.N., M.P. Wickens, F. Payvar, and R.T. Schimke. 1978. Synthesis of full length cDNAs from four partially purified oviduct mRNAs. *The Journal of biological chemistry*. 253:2471-2482.
- Buffone, M.G., E. Rodriguez-Miranda, B.T. Storey, and G.L. Gerton. 2009. Acrosomal exocytosis of mouse sperm progresses in a consistent direction in response to zona pellucida. *J Cell Physiol*. 220:611-620.
- Buiakova, O.I., H. Baker, J.W. Scott, A. Farbman, R. Kream, M. Grillo, L. Franzen, M. Richman, L.M. Davis, S. Abbondanzo, C.L. Stewart, and F.L. Margolis. 1996. Olfactory marker protein (OMP) gene deletion causes altered physiological activity of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:9858-9863.
- Caicedo, A., E. Pereira, R.F. Margolskee, and S.D. Roper. 2003. Role of the G-Protein Subunit α -Gustducin in Taste Cell Responses to Bitter Stimuli. *The Journal of Neuroscience*. 23:9947-9952.
- Cali, T., D. Ottolini, and M. Brini. 2012. Mitochondrial Ca(2+) and neurodegeneration. *Cell Calcium*. 52:73-85.
- Campbell, N.A., J.B. Reece, and J. Markl. 2003. Biologie. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum.
- Campbell, N.A., J.B. Reece, and J. Marl. 2006. Biologie. 6., aktualisierte Auflage. München (ua): Pearson Studium 2006.

- Carlson, A.E., L.A. Burnett, D. del Camino, T.A. Quill, B. Hille, J.A. Chong, M.M. Moran, and D.F. Babcock. 2009. Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation. *PLoS One*. 4:0006844.
- Carlson, J.R. 2000. Insulation of signaling pathways: odor discrimination via olfactosomes? *Neuron*. 25:503-504.
- Carr, D.W., and T.S. Acott. 1989. Intracellular pH regulates bovine sperm motility and protein phosphorylation. *Biol Reprod*. 41:907-920.
- Chan, H.C., T.S. Zhou, W.O. Fu, W.P. Wang, Y.L. Shi, and P.Y. Wong. 1997. Cation and anion channels in rat and human spermatozoa. *Biochim Biophys Acta*. 14:117-129.
- Chandrashekar, J., M.A. Hoon, N.J. Ryba, and C.S. Zuker. 2006. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*. 444:288-294.
- Chandrashekar, J., K.L. Mueller, M.A. Hoon, E. Adler, L. Feng, W. Guo, C.S. Zuker, and N.J. Ryba. 2000. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*. 100:703-711.
- Chaudhari, N., and S.D. Roper. 2010. The cell biology of taste. *J Cell Biol*. 190:285-296.
- Chavez, J.C., J.J. Ferreira, A. Butler, J.L. De La Vega Beltran, C.L. Trevino, A. Darszon, L. Salkoff, and C.M. Santi. 2014. SL03 K⁺ channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. *J Biol Chem*. 289:32266-32275.
- Chen, J., Z. Chen, N.R. Chintagari, M. Bhaskaran, N. Jin, T. Narasaraaju, and L. Liu. 2006. Alveolar type I cells protect rat lung epithelium from oxidative injury. *J Physiol*. 2006 May 1;572(Pt 3):625-38. Epub 2006 Feb 23 doi:10.1113/jphysiol.2005.103465.
- Chen, Y., M.J. Cann, T.N. Litvin, V. Iourgenko, M.L. Sinclair, L.R. Levin, and J. Buck. 2000. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*. 289:625-628.
- Cheng, C.Y., E.W. Wong, H.H. Yan, and D.D. Mruk. 2010. Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances. *Mol Cell Endocrinol*. 315:49-56.
- Chiu, P.C., K.K. Lam, R.C. Wong, and W.S. Yeung. 2014. The identity of zona pellucida receptor on spermatozoa: an unresolved issue in developmental biology. *Semin Cell Dev Biol*. 30:86-95.
- Chuquimia, O.D., D.H. Petursdottir, N. Periolo, and C. Fernández. 2013. Alveolar Epithelial Cells Are Critical in Protection of the Respiratory Tract by Secretion of Factors Able To Modulate the Activity of Pulmonary Macrophages and Directly Control Bacterial Growth. *Infection and Immunity*. 81:381-389.
- Clapham, D.E. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 426:517-524.
- Clapp, T.R., L.M. Stone, R.F. Margolskee, and S.C. Kinnamon. 2001. Immunocytochemical evidence for co-expression of Type III IP3 receptor with signaling components of bitter taste transduction. *BMC Neurosci*. 2:23.
- Clapp, T.R., K.R. Trubey, A. Vandenbeuch, L.M. Stone, R.F. Margolskee, N. Chaudhari, and S.C. Kinnamon. 2008. Tonic activity of Galphagustducin regulates taste cell responsivity. *FEBS Lett*. 582:3783-3787.
- Clark, G.F., and A. Dell. 2006. Molecular models for murine sperm-egg binding. *J Biol Chem*. 281:13853-13856.
- Cohen-Salmon, C., M. Carlier, P. Roubertoux, J. Jouhaneau, C. Semal, and M. Paillette. 1985. Differences in patterns of pup care in mice. V--Pup ultrasonic emissions and pup care behavior. *Physiol Behav*. 35:167-174.
- Cooper, T.G. 2005. Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Hum Reprod*. 20:9-11.
- Cornwall, G.A. 2009. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update*. 2009 Mar-Apr;15(2):213-27. Epub 2009 Jan 8 doi:10.1093/humupd/dmn055.
- Crinò, A., R. Schiaffini, P. Ciampalini, S. Spera, L. Beccaria, F. Benzi, L. Bosio, A. Corrias, L. Gargantini, A. Salvatoni, G. Tonini, G. Trifirò, and C. Livieri. 2003. Hypogonadism and pubertal development in Prader-Willi syndrome. *European Journal of Pediatrics*. 162:327-333.

- Cui, M., P. Jiang, E. Maillet, M. Max, R.F. Margolskee, and R. Osman. 2006. The heterodimeric sweet taste receptor has multiple potential ligand binding sites. *Current pharmaceutical design*. 12:4591-4600.
- Damak, S., M. Rong, K. Yasumatsu, Z. Kokrashvili, C.A. Perez, N. Shigemura, R. Yoshida, B. Mosinger, Jr., J.I. Glendinning, Y. Ninomiya, and R.F. Margolskee. 2006. Trpm5 null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds. *Chem Senses*. 31:253-264.
- Darszon, A., P. Lopez-Martinez, J.J. Acevedo, A. Hernandez-Cruz, and C.L. Trevino. 2006. T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *Cell Calcium*. 40:241-252.
- Darszon, A., T. Nishigaki, C. Beltran, and C.L. Trevino. 2011. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev*. 91:1305-1355.
- Darzynkiewicz, Z., D. Galkowski, and H. Zhao. 2008. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*. 44:250-254.
- David, A., A. Vilensky, and H. Nathan. 1971. [Temperature changes in different parts of the rabbit oviduct. Preliminary report]. *Harefuah*. 80:180-182.
- Day, C.S., and B.G. Galef. 1977. Pup cannibalism: One aspect of maternal behavior in golden hamsters. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 91:1179.
- De Jonge, C. 2005. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update*. 11:205-214.
- de Kretser, D.M., K.L. Loveland, A. Meinhardt, D. Simorangkir, and N. Wreford. 1998. Spermatogenesis. *Hum Reprod*. 1:1-8.
- de Lamirande, E., P. Leclerc, and C. Gagnon. 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod*. 3:175-194.
- de Liz Oliveira Cavalli, V.L., D. Cattani, C.E. Heinz Rieg, P. Pierozan, L. Zanatta, E. Benedetti Parisotto, D. Wilhelm Filho, F.R. Mena Barreto Silva, R. Pessoa-Pureur, and A. Zamonier. 2013. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radic Biol Med*. 65:335-346.
- Demarco, I.A., F. Espinosa, J. Edwards, J. Sosnik, J.L. De La Vega-Beltran, J.W. Hockensmith, G.S. Kopf, A. Darszon, and P.E. Visconti. 2003. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem*. 278:7001-7009.
- Deshpande, D.A., W.C. Wang, E.L. McIlmoyle, K.S. Robinett, R.M. Schillinger, S.S. An, J.S. Sham, and S.B. Liggett. 2010. Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nat Med*. 16:1299-1304.
- Dessauer, C.W., and A.G. Gilman. 1996. Purification and characterization of a soluble form of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem*. 271:16967-16974.
- Devoto, E., M. Madariaga, and X. Lioi. 2000. [Causes of male infertility. The contribution of the endocrine factor]. *Rev Med Chil*. 128:184-192.
- Dewan, A., R. Pacifico, R. Zhan, D. Rinberg, and T. Bozza. 2013. Non-redundant coding of aversive odours in the main olfactory pathway. *Nature*. 497:486-489.
- Dietrich, A., Y.S.M. Mederos, M. Gollasch, V. Gross, U. Storch, G. Dubrovskaya, M. Obst, E. Yildirim, B. Salanova, H. Kalwa, K. Essin, O. Pinkenburg, F.C. Luft, T. Gudermann, and L. Birnbaumer. 2005. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol Cell Biol*. 25:6980-6989.
- Dodé, C., and J.P. Hardelin. 2009. Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2009 Feb;17(2):139-46. Epub 2008 Nov 5 doi:10.1038/ejhg.2008.206.
- Doetschman, T. 2009. Influence of Genetic Background on Genetically Engineered Mouse Phenotypes. *Methods Mol Biol*. 2009;530:423-33. doi:10.1007/978-1-59745-471-1_23.

- Don, R.H., P.T. Cox, B.J. Wainwright, K. Baker, and J.S. Mattick. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*. 19:4008.
- Dooley, R., S. Baumgart, S. Rasche, H. Hatt, and E.M. Neuhaus. 2009. Olfactory receptor signaling is regulated by the post-synaptic density 95, *Drosophila* discs large, zona-occludens 1 (PDZ) scaffold multi-PDZ domain protein 1. *Febs J*. 276:7279-7290.
- Dotson, C.D., L. Zhang, H. Xu, Y.K. Shin, S. Vignes, S.H. Ott, A.E. Elson, H.J. Choi, H. Shaw, J.M. Egan, B.D. Mitchell, X. Li, N.I. Steinle, and S.D. Munger. 2008. Bitter taste receptors influence glucose homeostasis. *PLoS One*. 3:18.
- Dulac, C., and R. Axel. 1995. A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell*. 83:195-206.
- Eberle, J.A., P. Richter, P. Widmayer, V. Chubanov, T. Gudermann, and H. Breer. 2013. Band-like arrangement of taste-like sensory cells at the gastric groove: evidence for paracrine communication. *Front Physiol*. 4.
- Ehret, G., and C. Bernecker. 1986. Low-frequency sound communication by mouse pups (*Mus musculus*): wriggling calls release maternal behaviour. *Animal Behaviour*. 34:821-830.
- Eisenbach, M., and L.C. Giojalas. 2006. Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:276-285.
- Eliasson, R. 1966. Cholesterol in human semen. *Biochem J*. 98:242-243.
- Enklaar, T., M. Esswein, M. Oswald, K. Hilbert, A. Winterpacht, M. Higgins, B. Zabel, and D. Prawitt. 2000. Mtr1, a novel biallelically expressed gene in the center of the mouse distal chromosome 7 imprinting cluster, is a member of the Trp gene family. *Genomics*. 67:179-187.
- Escalier, D., J.M. Gallo, M. Albert, G. Meduri, D. Bermudez, G. David, and J. Schrevel. 1991. Human acrosome biogenesis: immunodetection of proacrosin in primary spermatocytes and of its partitioning pattern during meiosis. *Development*. 113:779-788.
- Esteves, S.C., and S. Verza Jr. 2011. Relationship of in vitro acrosome reaction to sperm function: an update. *Open Reprod Sci J*. 3:72-84.
- Farbman, A.I., and F.L. Margolis. 1980. Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev Biol*. 74:205-215.
- Fehr, J., D. Meyer, P. Widmayer, H.C. Borth, F. Ackermann, B. Wilhelm, T. Gudermann, and I. Boekhoff. 2007. Expression of the G-protein alpha-subunit gustducin in mammalian spermatozoa. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. 193:21-34.
- Feldmesser, E., T. Olender, M. Khen, I. Yanai, R. Ophir, and D. Lancet. 2006. Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes. *BMC Genomics*. 7:121.
- Finger, T.E., B. Bottger, A. Hansen, K.T. Anderson, H. Alimohammadi, and W.L. Silver. 2003. Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:8981-8986.
- Finger, T.E., V. Danilova, J. Barrows, D.L. Bartel, A.J. Vigers, L. Stone, G. Hellekant, and S.C. Kinnamon. 2005. ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science*. 310:1495-1499.
- Finger, T.E., and S.C. Kinnamon. 2011. Taste isn't just for taste buds anymore. *F1000 Biol Rep*. 3:1.
- Firestein, S. 2001. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*. 413:211-218.
- Flaherty, L. 1981. Congenic strains. In "The Mouse in Biomedical Research". *Academic Press, New York*. 1:215-222.
- Flegel, C., S. Manteniotis, S. Osthold, H. Hatt, and G. Gisselmann. 2013. Expression profile of ectopic olfactory receptors determined by deep sequencing. *PLoS One*. 8:6.

- Fleischer, J., and H. Breer. 2010. The Grueneberg ganglion: a novel sensory system in the nose. *Histol Histopathol.* 25:909-915.
- Fleischer, J., H. Breer, and J. Strotmann. 2009. Mammalian Olfactory Receptors. *Front Cell Neurosci.* 2009;3:9. doi:10.3389/neuro.03.009.2009.
- Fleischer, J., K. Schwarzenbacher, and H. Breer. 2007. Expression of trace amine-associated receptors in the Grueneberg ganglion. *Chem Senses.* 32:623-631.
- Flesch, F.M., J.F.H.M. Brouwers, P.F.E.M. Nievelstein, A.J. Verkleij, L.M.G. van Golde, B. Colenbrander, and B.M. Gadella. 2001. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *Journal of Cell Science.* 114:3543-3555.
- Floriano, W.B., S. Hall, N. Vaidehi, U. Kim, D. Drayna, and W.A. Goddard III. 2006. Modeling the human PTC bitter-taste receptor interactions with bitter tastants. *Journal of molecular modeling.* 12:931-941.
- Florman, H.M., M.K. Jungnickel, and K.A. Sutton. 2008. Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol.* 52:503-510.
- Forni, P.E., and S. Wray. 2015. GnRH, anosmia and hypogonadotropic hypogonadism--where are we? *Front Neuroendocrinol.* 36:165-177.
- Francia, S., S. Pifferi, A. Menini, and R. Tirindelli. 2014. Vomeronasal Receptors and Signal Transduction in the Vomeronasal Organ of Mammals.
- Fraser, L.R. 2010. The "switching on" of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. *Mol Reprod Dev.* 77:197-208.
- Freitag, J., G. Ludwig, I. Andreini, P. Rossler, and H. Breer. 1998. Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates. *J Comp Physiol A.* 183:635-650.
- Fukami, K., M. Yoshida, T. Inoue, M. Kurokawa, R.A. Fissore, N. Yoshida, K. Mikoshiba, and T. Takenawa. 2003. Phospholipase Cdelta4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J Cell Biol.* 161:79-88.
- Fukuda, N., K. Yomogida, M. Okabe, and K. Touhara. 2004. Functional characterization of a mouse testicular olfactory receptor and its role in chemosensing and in regulation of sperm motility. *J Cell Sci.* 117:5835-5845.
- Gadella, B.M. 2012. Dynamic regulation of sperm interactions with the zona pellucida prior to and after fertilisation. *Reprod Fertil Dev.* 25:26-37.
- Gadella, B.M., and R.A. Harrison. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development.* 127:2407-2420.
- Garbers, D.L. 2001. Ion channels: Swimming with sperm. *Nature.* 413:579-582.
- Giwerzman, A., L. Rylander, and Y. Lundberg Giwerzman. 2007. Influence of endocrine disruptors on human male fertility. *Reprod Biomed Online.* 15:633-642.
- Glendinning, J.I., Y.M. Yiin, K. Ackroff, and A. Scalfani. 2008. Intragastric infusion of denatonium conditions flavor aversions and delays gastric emptying in rodents. *Physiol Behav.* 93:757-765.
- Gohla, A., K. Klement, R.P. Piekorz, K. Pexa, S. vom Dahl, K. Spicher, V. Dreval, D. Haussinger, L. Birnbaumer, and B. Nurnberg. 2007. An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein Gi3 in the antiautophagic action of insulin in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:3003-3008.
- Greeley, G. 1998. *Gastrointestinal Endocrinology.* Springer Science & Business Media.
- Greenhouse, D.D., Festing, M.F., Hasan, S. and Cohen, A.L. 1990. Catalogue of inbred strains of rats. In "Genetic monitoring of inbred strains of rats".410-480.

- Griffin, C.A., K.A. Kafadar, and G.K. Pavlath. 2009. MOR23 promotes muscle regeneration and regulates cell adhesion and migration. *Dev Cell*. 17:649-661.
- Griswold, M.D. 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 9:411-416.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*. 260:3440-3450.
- Gu, X., P.H. Karp, S.L. Brody, R.A. Pierce, M.J. Welsh, M.J. Holtzman, and Y. Ben-Shahar. 2014. Chemosensory functions for pulmonary neuroendocrine cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 50:637-646.
- Guidobaldi, H.A., M.E. Teves, D.R. Unates, A. Anastasia, and L.C. Giojalas. 2008. Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS One*. 3:0003040.
- Guo, Y., P. Xiao, S. Lei, F. Deng, G.G. Xiao, Y. Liu, X. Chen, L. Li, S. Wu, Y. Chen, H. Jiang, L. Tan, J. Xie, X. Zhu, S. Liang, and H. Deng. 2008. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin*. 40:426-436.
- Gupta, A., A.S. Heimann, I. Gomes, and L.A. Devi. 2008. Antibodies against G-protein coupled receptors: novel uses in screening and drug development. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. 11:463-467.
- Hamamah, S., and J.L. Gatti. 1998. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Hum Reprod*. 4:20-30.
- Happ, G.M. 1992. Maturation of the male reproductive system and its endocrine regulation. *Annu Rev Entomol*. 37:303-320.
- Hartung, T.G., and D.A. Dewsbury. 1978. A comparative analysis of copulatory plugs in muroid rodents and their relationship to copulatory behavior. *Journal of Mammalogy*. 59:717-723.
- Hashiguchi, Y., and M. Nishida. 2007. Evolution of trace amine associated receptor (TAAR) gene family in vertebrates: lineage-specific expansions and degradations of a second class of vertebrate chemosensory receptors expressed in the olfactory epithelium. *Mol Biol Evol*. 24:2099-2107.
- Hass, N., K. Schwarzenbacher, and H. Breer. 2007. A cluster of gustducin-expressing cells in the mouse stomach associated with two distinct populations of enteroendocrine cells. *Histochem Cell Biol*. 128:457-471.
- Hass, N., K. Schwarzenbacher, and H. Breer. 2010. T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach. *Cell Tissue Res*. 339:493-504.
- Hayden, S., and E.C. Teeling. 2014. The molecular biology of vertebrate olfaction. *Anat Rec*. 297:2216-2226.
- Heck, G.L., S. Mierson, and J.A. DeSimone. 1984. Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science*. 223:403-405.
- Heindel, J.J., and K.A. Treinen. 1989. Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Toxicol Pathol*. 17:411-445.
- Henquin, J.C. 2012. Do pancreatic beta cells "taste" nutrients to secrete insulin? *Sci Signal*. 5:2003325.
- Heydecke, D., D. Meyer, F. Ackermann, B. Wilhelm, T. Gudermann, and I. Boekhoff. 2006. The multi PDZ domain protein MUPP1 as a putative scaffolding protein for organizing signaling complexes in the acrosome of mammalian spermatozoa. *J Androl*. 27:390-404.
- Hildebrand, M.S., M.R. Avenarius, M. Fellous, Y. Zhang, N.C. Meyer, J. Auer, C. Serres, K. Kahrizi, H. Najmabadi, J.S. Beckmann, and R.J. Smith. 2010. Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet*. 18:1178-1184.
- Hofer, D., and D. Drenckhahn. 1996. Cytoskeletal markers allowing discrimination between brush cells and other epithelial cells of the gut including enteroendocrine cells. *Histochem Cell Biol*. 105:405-412.

- Hofmann, T., V. Chubanov, T. Gudermann, and C. Montell. 2003. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol.* 13:1153-1158.
- Hoon, M.A., E. Adler, J. Lindemeier, J.F. Battey, N.J. Ryba, and C.S. Zuker. 1999. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell.* 96:541-551.
- Huang, A.L., X. Chen, M.A. Hoon, J. Chandrashekar, W. Guo, D. Trankner, N.J. Ryba, and C.S. Zuker. 2006. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature.* 442:934-938.
- Huang, L., M. Max, R.F. Margolskee, H. Su, R.H. Masland, and T. Euler. 2003. G protein subunit G gamma 13 is coexpressed with G alpha o, G beta 3, and G beta 4 in retinal ON bipolar cells. *J Comp Neurol.* 455:1-10.
- Huang, L.O., A. Labbe, and C. Infante-Rivard. 2013. Transmission ratio distortion: review of concept and implications for genetic association studies. *Hum Genet.* 132:245-263.
- Huang, Y.A., R. Dando, and S.D. Roper. 2009. Autocrine and paracrine roles for ATP and serotonin in mouse taste buds. *J Neurosci.* 29:13909-13918.
- Huang, Y.A., L.M. Stone, E. Pereira, R. Yang, J.C. Kinnamon, G. Dvoryanchikov, N. Chaudhari, T.E. Finger, S.C. Kinnamon, and S.D. Roper. 2011. Knocking out P2X receptors reduces transmitter secretion in taste buds. *J Neurosci.* 31:13654-13661.
- Huang, Y.J., Y. Maruyama, G. Dvoryanchikov, E. Pereira, N. Chaudhari, and S.D. Roper. 2007. The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:6436-6441.
- Huber, A., P. Sander, and R. Paulsen. 1996. Phosphorylation of the InaD gene product, a photoreceptor membrane protein required for recovery of visual excitation. *J Biol Chem.* 271:11710-11717.
- Hunter, R.H., and R. Nichol. 1986. A preovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *J Reprod Fertil.* 77:599-606.
- Hutchings, C.J., M. Koglin, and F.H. Marshall. 2010. Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *MAbs.* 2:594-606.
- Inoue, N., M. Ikawa, T. Nakanishi, M. Matsumoto, M. Nomura, T. Seya, and M. Okabe. 2003. Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Mol Cell Biol.* 23:2614-2622.
- Ishimaru, Y., H. Inada, M. Kubota, H. Zhuang, M. Tominaga, and H. Matsunami. 2006. Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:12569-12574.
- Ivell, R., J.D. Wade, and R. Anand-Ivell. 2013. INSL3 as a biomarker of Leydig cell functionality. *Biol Reprod.* 88.
- Ivic, L., M.M. Pyrski, J.W. Margolis, L.J. Richards, S. Firestein, and F.L. Margolis. 2000. Adenoviral vector-mediated rescue of the OMP-null phenotype in vivo. *Nat Neurosci.* 3:1113-1120.
- Iwatsuki, K., M. Nomura, A. Shibata, R. Ichikawa, P.L. Enciso, L. Wang, R. Takayanagi, K. Torii, and H. Uneyama. 2010. Generation and characterization of T1R2-LacZ knock-in mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 402:495-499.
- Jin, J.M., and W.X. Yang. 2014. Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males. *Gene.* 551:15-25.
- Jin, M., E. Fujiwara, Y. Kakiuchi, M. Okabe, Y. Satouh, S.A. Baba, K. Chiba, and N. Hirohashi. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:4892-4896.
- Johnson, M.H. 1970. Changes in the blood-testis barrier of the guinea-pig in relation to histological damage following iso-immunization with testis. *J Reprod Fertil.* 22:119-127.

- Jones, R., E. Howes, P.D. Dunne, P. James, A. Bruckbauer, and D. Klenerman. 2010. Tracking diffusion of GM1 gangliosides and zona pellucida binding molecules in sperm plasma membranes following cholesterol efflux. *Dev Biol.* 339:398-406.
- Jones, R.C. 1999. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *Int J Androl.* 22:57-67.
- Kaji, I., S. Karaki, Y. Fukami, M. Terasaki, and A. Kuwahara. 2009. Secretory effects of a luminal bitter tastant and expressions of bitter taste receptors, T2Rs, in the human and rat large intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 296:29.
- Kaluza, J.F., F. Gussing, S. Bohm, H. Breer, and J. Strotmann. 2004. Olfactory receptors in the mouse septal organ. *J Neurosci Res.* 76:442-452.
- Kam, W.W., R. Middleton, V. Lake, and R.B. Banati. 2013. Green fluorescent protein alters the transcriptional regulation of human mitochondrial genes after gamma irradiation. *J Fluoresc.* 23:613-619.
- Kang, N., H. Kim, Y. Jae, N. Lee, C.R. Ku, F. Margolis, E.J. Lee, Y.Y. Bahk, M.S. Kim, and J. Koo. 2015. Olfactory marker protein expression is an indicator of olfactory receptor-associated events in non-olfactory tissues. *PLoS One.* 10.
- Kang, N., and J. Koo. 2012. Olfactory receptors in non-chemosensory tissues. *BMB Rep.* 45:612-622.
- Kaske, S., G. Krasteva, P. Konig, W. Kummer, T. Hofmann, T. Gudermann, and V. Chubanov. 2007. TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC Neurosci.* 8:49.
- Katritch, V., V. Cherezov, and R.C. Stevens. 2013. Structure-Function of the G-protein-Coupled Receptor Superfamily. *Annual review of pharmacology and toxicology.* 53:531-556.
- Kaupp, U.B. 2010. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nat Rev Neurosci.* 11:188-200.
- Keller, A., and F.L. Margolis. 1975. Immunological studies of the rat olfactory marker protein. *J Neurochem.* 24:1101-1106.
- Keller, A., and L.B. Vosshall. 2008. Better smelling through genetics: mammalian odor perception. *Curr Opin Neurobiol.* 18:364-369.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26:239-257.
- Kierszenbaum, A.L. 2000. Fusion of membranes during the acrosome reaction: a tale of two SNAREs. *Mol Reprod Dev.* 57:309-310.
- Kierszenbaum, A.L., E. Rivkin, and L.L. Tres. 2007. Molecular biology of sperm head shaping. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 65:33-43.
- Kim, E., M. Yamashita, M. Kimura, A. Honda, S. Kashiwabara, and T. Baba. 2008. Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int J Dev Biol.* 52:677-682.
- Kim, Y.H., J.R. Hong, H.W. Gil, H.Y. Song, and S.Y. Hong. 2013. Mixtures of glyphosate and surfactant TN20 accelerate cell death via mitochondrial damage-induced apoptosis and necrosis. *Toxicol In Vitro.* 27:191-197.
- Kinnamon, S.C. 2012. Taste receptor signalling - from tongues to lungs. *Acta Physiol.* 204:158-168.
- Kinnamon, S.C., and T.E. Finger. 2013. A taste for ATP: neurotransmission in taste buds. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:264. doi:10.3389/fncel.2013.00264.
- Kinnamon, S.C., and S.D. Reynolds. 2009. Cell biology. Using taste to clear the air(ways). *Science.* 325:1081-1082.

- Kirichok, Y., B. Navarro, and D.E. Clapham. 2006. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature*. 439:737-740.
- Kirkman-Brown, J.C., E.L. Punt, C.L. Barratt, and S.J. Publicover. 2002. Zona pellucida and progesterone-induced Ca²⁺ signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J Androl*. 23:306-315.
- Klemm, M., and W. Engel. 1991. On the capacity of mouse spermatozoa for spontaneous acrosome reaction in the male and female genital tract. *Andrologia*. 23:427-433.
- Kohn, F.M. 2004. [Diagnosis and therapy of hypogonadism in adult males]. *Urologe A*. 43:1563-1581.
- Kokrashvili, Z., B. Mosinger, and R.F. Margolskee. 2009a. Taste signaling elements expressed in gut enteroendocrine cells regulate nutrient-responsive secretion of gut hormones. *Am J Clin Nutr*. 90:1.
- Kokrashvili, Z., D. Rodriguez, V. Yevshayeva, H. Zhou, R.F. Margolskee, and B. Mosinger. 2009b. Release of endogenous opioids from duodenal enteroendocrine cells requires Trpm5. *Gastroenterology*. 137:598-606.
- Kokrashvili, Z., K.K. Yee, E. Ilegems, K. Iwatsuki, Y. Li, B. Mosinger, and R.F. Margolskee. 2014. Endocrine taste cells. *Br J Nutr*. 111:2.
- König, B., and H. Markl. 1987. Maternal care in house mice. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 20:1-9.
- Korkmaz, Y., D. Steinritz, and W. Bloch. 2005. Practical Use of in situ Hybridisation and RT in situ PCR in Cardiovascular Research. In *Practical Methods in Cardiovascular Research*. S. Dhein, F. Mohr, and M. Delmar, editors. Springer Berlin Heidelberg. 500-524.
- Krautwurst, D., K.W. Yau, and R.R. Reed. 1998. Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell*. 95:917-926.
- Kumar, P., N. Kumar, D.S. Thakur, and A. Patidar. 2010. Male hypogonadism: Symptoms and treatment. *J Adv Pharm Technol Res*. 2010 Jul-Sep;1(3):297-301. doi:10.4103/0110-5558.72420.
- Kusumakshi, S., A. Voigt, S. Hubner, I. Hermans-Borgmeyer, A. Ortalli, M. Pyrski, J. Dorr, F. Zufall, V. Flockerzi, W. Meyerhof, J.P. Montmayeur, and U. Boehm. 2015. A Binary Genetic Approach to Characterize TRPM5 Cells in Mice. *Chem Senses*. 40:413-425.
- Kwon, H.J., J.H. Koo, F. Zufall, T. Leinders-Zufall, and F.L. Margolis. 2009. Ca extrusion by NCX is compromised in olfactory sensory neurons of OMP mice. *PLoS One*. 4:23.
- La Spina, F.A., L.C. Puga Molina, A. Romarowski, A.M. Vitale, T.L. Falzone, D. Krapf, N. Hirohashi, and M.G. Buffone. 2016. Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Dev Biol*. 411:172-182.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Laffitte, A., F. Neiers, and L. Briand. 2014. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014 Jul;17(4):379-85. Epub 2014 May 6
doi:10.1097/MCO.000000000000058.
- Lange, S., and R. Bender. 2007. Median oder Mittelwert. *Dtsch Med Wochenschr*. 132:e1-2.
- Larsson, M.H., P. Hakansson, F.P. Jansen, K. Magnell, and P. Brodin. 2015. Ablation of TRPM5 in Mice Results in Reduced Body Weight Gain and Improved Glucose Tolerance and Protects from Excessive Consumption of Sweet Palatable Food when Fed High Caloric Diets. *PLoS One*. 10.
- Leclerc, P., E. de Lamirande, and C. Gagnon. 1996. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod*. 55:684-692.

- Lee, A.C., J. He, and M. Ma. 2011. Olfactory marker protein is critical for functional maturation of olfactory sensory neurons and development of mother preference. *J Neurosci.* 31:2974-2982.
- Lefièvre, L., G. Machado-Oliveira, C. Ford, J. Kirkman-Brown, C. Barratt, and S. Publicover. 2009. Communication between female tract and sperm: Saying NO• when you mean yes. *Communicative & Integrative Biology.* 2:82-85.
- Lefkowitz, R.J. 2013. A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013 Jun 17;52(25):6366-78. doi: 10.1002/anie.201301924. Epub 2013 May 6.
- Levai, O., T. Feistel, H. Breer, and J. Strotmann. 2006. Cells in the vomeronasal organ express odorant receptors but project to the accessory olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 498:476-490.
- Li, F. 2013. Taste perception: from the tongue to the testis. *Mol Hum Reprod.* 19:349-360.
- Li, F., and M. Zhou. 2012. Depletion of bitter taste transduction leads to massive spermatid loss in transgenic mice. *Mol Hum Reprod.* 18:289-297.
- Li, J.J., H.L. Tay, M. Plank, A.T. Essilfie, P.M. Hansbro, P.S. Foster, and M. Yang. 2013. Activation of olfactory receptors on mouse pulmonary macrophages promotes monocyte chemotactic protein-1 production. *PLoS One.* 8.
- Li, X., L. Staszewski, H. Xu, K. Durick, M. Zoller, and E. Adler. 2002. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:4692-4696.
- Liberles, S.D., L.F. Horowitz, D. Kuang, J.J. Contos, K.L. Wilson, J. Siltberg-Liberles, D.A. Liberles, and L.B. Buck. 2009. Formyl peptide receptors are candidate chemosensory receptors in the vomeronasal organ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:9842-9847.
- Lillie, R.D., P. Pizzolato, and P.T. Donaldson. 1976. Nuclear stains with soluble metachrome metal mordant dye lakes. The effect of chemical endgroup blocking reactions and the artificial introduction of acid groups into tissues. *Histochemistry.* 49:23-35.
- Liman, E.R. 2014. Trpm5. *Handb Exp Pharmacol.* 222:489-502.
- Lin, W., E.A. Ezekwe, Jr., Z. Zhao, E.R. Liman, and D. Restrepo. 2008. TRPM5-expressing microvillous cells in the main olfactory epithelium. *BMC Neurosci.* 9:1471-2202.
- Lin, W., R. Margolskee, G. Donnert, S.W. Hell, and D. Restrepo. 2007. Olfactory neurons expressing transient receptor potential channel M5 (TRPM5) are involved in sensing semiochemicals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:2471-2476.
- Linder, C.C. 2006. Genetic Variables That Influence Phenotype. *ILAR Journal.* 47:132-140.
- Lishko, P.V., I.L. Botchkina, A. Fedorenko, and Y. Kirichok. 2010. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell.* 140:327-337.
- Lishko, P.V., I.L. Botchkina, and Y. Kirichok. 2011. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature.* 471:387-391.
- Litvin, T.N., M. Kamenetsky, A. Zarifyan, J. Buck, and L.R. Levin. 2003. Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem.* 278:15922-15926.
- Liu, C., and T.E. Hermann. 1978. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *The Journal of biological chemistry.* 253:5892-5894.
- Liu, C.Y., S.E. Fraser, and D.S. Koos. 2009. Grueneberg ganglion olfactory subsystem employs a cGMP signaling pathway. *J Comp Neurol.* 516:36-48.
- Liu, D., and E.R. Liman. 2003. Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:15160-15165.

- Liu, D.Y., and H.W. Baker. 1996. A simple method for assessment of the human acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: lack of relationship with ionophore A23187-induced acrosome reaction. *Hum Reprod.* 11:551-557.
- Liu, D.Y., and H.W. Baker. 1998. Calcium ionophore-induced acrosome reaction correlates with fertilization rates in vitro in patients with teratozoospermic semen. *Hum Reprod.* 13:905-910.
- Liu, M., and M.I. Simon. 1996. Regulation by cAMP-dependent protein kinase of a G-protein-mediated phospholipase C. *Nature.* 382:83-87.
- Liu, P., B.P. Shah, S. Croasdell, and T.A. Gilbertson. 2011. Transient receptor potential channel type M5 is essential for fat taste. *J Neurosci.* 31:8634-8642.
- Liu, Y., D.K. Wang, and L.M. Chen. 2012a. The physiology of bicarbonate transporters in mammalian reproduction. *Biol Reprod.* 86.
- Liu, Z., C. Fenech, H. Cadiou, S. Grall, E. Tili, F. Laugerette, A. Wiencis, X. Grosmaître, and J.P. Montmayeur. 2012b. Identification of new binding partners of the chemosensory signaling protein Ggamma13 expressed in taste and olfactory sensory cells. *Front Cell Neurosci.* 6.
- Lohmann-Matthes, M., C. Steinmüller, and G. Franke-Ullmann. 1994. Pulmonary macrophages. *European Respiratory Journal.* 7:1678-1689.
- Lopez, F., R. Delgado, R. Lopez, J. Bacigalupo, and D. Restrepo. 2014. Transduction for pheromones in the main olfactory epithelium is mediated by the Ca²⁺-activated channel TRPM5. *J Neurosci.* 34:3268-3278.
- Lottspeich, F. 2006. In Lottspeich, F. & Zorbas, H. (Hrsg.) Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Luciano, L., and E. Reale. 1992. The "limiting ridge" of the rat stomach. *Archives of histology and cytology.* 55:131-138.
- Lyon, M.F. 2003. Transmission ratio distortion in mice. *Annu Rev Genet.* 37:393-408.
- Lyttle, T.W. 1991. Segregation distorters. *Annu Rev Genet.* 25:511-557.
- Ma, M. 2007. Encoding olfactory signals via multiple chemosensory systems. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 42:463-480.
- Malaisse, W.J. 1988. Calcium entry and activation of endocrine cells. *Ann N Y Acad Sci.* 522:284-295.
- Margolis, F.L. 1972. A brain protein unique to the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 69:1221-1224.
- Margolskee, R.F. 2002. Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *J Biol Chem.* 277:1-4.
- Masuda, K., A. Koizumi, K. Nakajima, T. Tanaka, K. Abe, T. Misaka, and M. Ishiguro. 2012. Characterization of the Modes of Binding between Human Sweet Taste Receptor and Low-Molecular-Weight Sweet Compounds. *PLoS One.* 2012;7(4):e35380. doi:10.1371/journal.pone.0035380.
- Matsunami, H., and L.B. Buck. 1997. A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell.* 90:775-784.
- Max, M., Y.G. Shanker, L. Huang, M. Rong, Z. Liu, F. Campagne, H. Weinstein, S. Damak, and R.F. Margolskee. 2001. Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac. *Nature genetics.* 28:58-63.
- Mayorga, L.S., C.N. Tomes, and S.A. Belmonte. 2007. Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life.* 59:286-292.
- McKeel, D.W., and L. Jarett. 1970. Preparation and characterization of a plasma membrane fraction from isolated fat cells. *The Journal of cell biology.* 44:417-432.
- McLaughlin, S.K., P.J. McKinnon, and R.F. Margolskee. 1992. Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature.* 357:563-569.

- McLaughlin, S.K., P.J. McKinnon, A. Robichon, N. Spickofsky, and R.F. Margolskee. 1993. Gustducin and transducin: a tale of two G proteins. *Ciba Found Symp.* 179:186-196.
- Mellor, D.J., and K.J. Stafford. 2004. Animal welfare implications of neonatal mortality and morbidity in farm animals. *Vet J.* 168:118-133.
- Meyer, D. 2013. Dissertation " Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von Geschmacksrezeptoren in Spermien".
- Meyer, D., A. Voigt, P. Widmayer, H. Borth, S. Huebner, A. Breit, S. Marschall, M.H. de Angelis, U. Boehm, W. Meyerhof, T. Gudermann, and I. Boekhoff. 2012. Expression of Tas1 taste receptors in mammalian spermatozoa: functional role of Tas1r1 in regulating basal Ca(2)(+) and cAMP concentrations in spermatozoa. *PLoS One.* 7:29.
- Meyerhof, W., S. Born, A. Brockhoff, and M. Behrens. 2011. Molecular biology of mammalian bitter taste receptors. A review. *Flavour and Fragrance Journal.* 26:260-268.
- Miki, K., and D.E. Clapham. 2013. Rheotaxis guides mammalian sperm. *Curr Biol.* 23:443-452.
- Mitrovic, S., C. Nogueira, G. Cantero-Recasens, K. Kiefer, J.M. Fernandez-Fernandez, J.F. Popoff, L. Casano, F.A. Bard, R. Gomez, M.A. Valverde, and V. Malhotra. 2013. TRPM5-mediated calcium uptake regulates mucin secretion from human colon goblet cells. *Elife.* 28:00658.
- Moller, C.C., J.D. Bleil, R.A. Kinloch, and P.M. Wassarman. 1990. Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Developmental biology.* 137:276-286.
- Mombaerts, P. 1999. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science.* 286:707-711.
- Mombaerts, P. 2004. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat Rev Neurosci.* 5:263-278.
- Monroy, A. 1985. Processes controlling sperm-egg fusion. *Eur J Biochem.* 152:51-56.
- Montagutelli, X. 2000. Effect of the genetic background on the phenotype of mouse mutations. *J Am Soc Nephrol.* 11:S101-105.
- Montell, C., L. Birnbaumer, and V. Flockerzi. 2002. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell.* 108:595-598.
- Monti-Graziadei, G.A., F.L. Margolis, J.W. Harding, and P.P. Graziadei. 1977. Immunocytochemistry of the olfactory marker protein. *J Histochem Cytochem.* 25:1311-1316.
- Montmayeur, J.P., and H. Matsunami. 2002. Receptors for bitter and sweet taste. *Curr Opin Neurobiol.* 12:366-371.
- Mortimer, D., E.F. Curtis, A.R. Camenzind, and S. Tanaka. 1989. The spontaneous acrosome reaction of human spermatozoa incubated in vitro. *Hum Reprod.* 4:57-62.
- Mosinger, B., K.M. Redding, M.R. Parker, V. Yevshayeva, K.K. Yee, K. Dyomina, Y. Li, and R.F. Margolskee. 2013. Genetic loss or pharmacological blockade of testes-expressed taste genes causes male sterility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:12319-12324.
- Müller, U. 1999. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev.* 82:3-21.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology.* 51 Pt 1:263-273.
- Munger, S.D., T. Leinders-Zufall, and F. Zufall. 2009. Subsystem organization of the mammalian sense of smell. *Annu Rev Physiol.* 71:115-140.

- Navarrete, F.A., F.A. Garcia-Vazquez, A. Alvau, J. Escoffier, D. Krapf, C. Sanchez-Cardenas, A.M. Salicioni, A. Darszon, and P.E. Visconti. 2015. Biphasic role of calcium in mouse sperm capacitation signaling pathways. *J Cell Physiol.* 230:1758-1769.
- Navarro, B., Y. Kirichok, J.J. Chung, and D.E. Clapham. 2008. Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *Int J Dev Biol.* 52:607-613.
- Navarro, B., Y. Kirichok, and D.E. Clapham. 2007. KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:7688-7692.
- Naz, R.K., and P.B. Rajesh. 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004;2:75. doi:10.1186/1477-7827-2-75.
- Nelson, G., J. Chandrashekar, M.A. Hoon, L. Feng, G. Zhao, N.J. Ryba, and C.S. Zuker. 2002. An amino-acid taste receptor. *Nature.* 416:199-202.
- Neuhaus, E.M., W. Zhang, L. Gelis, Y. Deng, J. Noldus, and H. Hatt. 2009. Activation of an olfactory receptor inhibits proliferation of prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 284:16218-16225.
- Nixon, B., R.J. Aitken, and E.A. McLaughlin. 2007. New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. *Cell Mol Life Sci.* 64:1805-1823.
- Nolan, J.P., and R.H. Hammerstedt. 1997. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *Faseb J.* 11:670-682.
- Nolan, M.A., D.F. Babcock, G. Wennemuth, W. Brown, K.A. Burton, and G.S. McKnight. 2004. Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:13483-13488.
- O'Toole, C.M., C. Arnoult, A. Darszon, R.A. Steinhardt, and H.M. Florman. 2000. Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell.* 11:1571-1584.
- Oehninger, S., P. Blackmore, M. Morshedi, C. Sueldo, A.A. Acosta, and N.J. Alexander. 1994. Defective calcium influx and acrosome reaction (spontaneous and progesterone-induced) in spermatozoa of infertile men with severe teratozoospermia. *Fertil Steril.* 61:349-354.
- Ohsawa, K., Y. Imai, Y. Sasaki, and S. Kohsaka. 2004. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem.* 88:844-856.
- Okabe, M. 2013. The cell biology of mammalian fertilization. *Development.* 140:4471-4479.
- Oshimoto, A., Y. Wakabayashi, A. Garske, R. Lopez, S. Rolen, M. Flowers, N. Arevalo, and D. Restrepo. 2013. Potential role of transient receptor potential channel M5 in sensing putative pheromones in mouse olfactory sensory neurons. *PLoS One.* 8.
- Pacey, A.A., N. Davies, M.A. Warren, C.L. Barratt, and I.D. Cooke. 1995. Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Hum Reprod.* 10:2603-2609.
- Pardo-Manuel de Villena, F., and C. Sapienza. 2001. Nonrandom segregation during meiosis: the unfairness of females. *Mamm Genome.* 12:331-339.
- Paysan, J., and H. Breer. 2001. Molecular physiology of odor detection: current views. *Pflugers Arch.* 441:579-586.
- Perez, C.A., L. Huang, M. Rong, J.A. Kozak, A.K. Preuss, H. Zhang, M. Max, and R.F. Margolskee. 2002. A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci.* 5:1169-1176.
- Pin, J.P., J. Kniazeff, C. Goudet, A.S. Bessis, J. Liu, T. Galvez, F. Acher, P. Rondard, and L. Prezeau. 2004. The activation mechanism of class-C G-protein coupled receptors. *Biol Cell.* 96:335-342.

- Pluznick, J.L., R.J. Protzko, H. Gevorgyan, Z. Peterlin, A. Sipos, J. Han, I. Brunet, L.X. Wan, F. Rey, T. Wang, S.J. Firestein, M. Yanagisawa, J.I. Gordon, A. Eichmann, J. Peti-Peterdi, and M.J. Caplan. 2013. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:4410-4415.
- Pluznick, J.L., D.J. Zou, X. Zhang, Q. Yan, D.J. Rodriguez-Gil, C. Eisner, E. Wells, C.A. Greer, T. Wang, S. Firestein, J. Schnermann, and M.J. Caplan. 2009. Functional expression of the olfactory signaling system in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:2059-2064.
- Plymate, S.R., J.S. Tenover, and W.J. Bremner. 1989. Circadian variation in testosterone, sex hormone-binding globulin, and calculated non-sex hormone-binding globulin bound testosterone in healthy young and elderly men. *J Androl*. 10:366-371.
- Pradidarcheep, W., J. Stallen, W.T. Labruyere, N.F. Dabhoiwala, M.C. Michel, and W.H. Lamers. 2009. Lack of specificity of commercially available antisera against muscarinic and adrenergic receptors. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 379:397-402.
- Prandi, S., M. Bromke, S. Hubner, A. Voigt, U. Boehm, W. Meyerhof, and M. Behrens. 2013. A subset of mouse colonic goblet cells expresses the bitter taste receptor Tas2r131. *PLoS One*. 8.
- Qi, H., M.M. Moran, B. Navarro, J.A. Chong, G. Krapivinsky, L. Krapivinsky, Y. Kirichok, I.S. Ramsey, T.A. Quill, and D.E. Clapham. 2007. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:1219-1223.
- Quill, T.A., S.A. Sugden, K.L. Rossi, L.K. Doolittle, R.E. Hammer, and D.L. Garbers. 2003. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:14869-14874.
- Rahman, M.S., W.S. Kwon, and M.G. Pang. 2014. Calcium influx and male fertility in the context of the sperm proteome: an update. *Biomed Res Int*. 841615:27.
- Rahman, M.S., J.S. Lee, W.S. Kwon, and M.G. Pang. 2013. Sperm proteomics: road to male fertility and contraception. *Int J Endocrinol*. 360986:1.
- Ramalho-Santos, J., G. Schatten, and R.D. Moreno. 2002. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biol Reprod*. 67:1043-1051.
- Reisert, J., P.J. Bauer, K.W. Yau, and S. Frings. 2003. The Ca-activated Cl channel and its control in rat olfactory receptor neurons. *J Gen Physiol*. 122:349-363.
- Reisert, J., K.W. Yau, and F.L. Margolis. 2007. Olfactory marker protein modulates the cAMP kinetics of the odour-induced response in cilia of mouse olfactory receptor neurons. *J Physiol*. 585:731-740.
- Ren, D., B. Navarro, G. Perez, A.C. Jackson, S. Hsu, Q. Shi, J.L. Tilly, and D.E. Clapham. 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*. 413:603-609.
- Reuter, D., K. Zierold, W.H. Schroder, and S. Frings. 1998. A depolarizing chloride current contributes to chemoelectrical transduction in olfactory sensory neurons in situ. *J Neurosci*. 18:6623-6630.
- Rice, E.W., and P.A. Hammer. 1969. Improved solution technic for spectrophotometry of Ponceau S-stained cellulose acetate electrophoretograms. *Technical bulletin of the Registry of Medical Technologists*. 39:17-18.
- Riviere, S., L. Challet, D. Fluegge, M. Spehr, and I. Rodriguez. 2009. Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors. *Nature*. 459:574-577.
- Rodriguez, I., and P. Mombaerts. 2002. Novel human vomeronasal receptor-like genes reveal species-specific families. *Curr Biol*. 2002 Jun 25;12(12):R409-11.
- Roldan, E.R., T. Murase, and Q.X. Shi. 1994. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science*. 266:1578-1581.
- Roldan, E.R., and Q.X. Shi. 2007. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci*. 12:89-104.

- Rolen, S.H., E. Salcedo, D. Restrepo, and T.E. Finger. 2014. Differential localization of NT-3 and TrpM5 in glomeruli of the olfactory bulb of mice. *J Comp Neurol.* 522:1929-1940.
- Romanov, R.A., O.A. Rogachevskaja, M.F. Bystrova, P. Jiang, R.F. Margolskee, and S.S. Kolesnikov. 2007. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *Embo J.* 26:657-667.
- Roper, S.D. 2007. Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflugers Arch.* 454:759-776.
- Roper, S.D., and N. Chaudhari. 2009. Processing umami and other tastes in mammalian taste buds. *Ann N Y Acad Sci.*
- Rosenbaum, D.M., S.G. Rasmussen, and B.K. Kobilka. 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature.* 459:356-363.
- Rossato, M., F. Di Virgilio, R. Rizzuto, C. Galeazzi, and C. Foresta. 2001. Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction in human spermatozoa: role of calcium and plasma membrane potential. *Mol Hum Reprod.* 7:119-128.
- Rossler, P., C. Kroner, J. Freitag, J. Noe, and H. Breer. 1998. Identification of a phospholipase C beta subtype in rat taste cells. *Eur J Cell Biol.* 77:253-261.
- Rozengurt, E., and C. Sternini. 2007. Taste receptor signaling in the mammalian gut. *Curr Opin Pharmacol.* 7:557-562.
- Ruknudin, A., and I.A. Silver. 1990. Ca²⁺ uptake during capacitation of mouse spermatozoa and the effect of an anion transport inhibitor on Ca²⁺ uptake. *Mol Reprod Dev.* 26:63-68.
- Ryba, N.J., and R. Tirindelli. 1997. A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron.* 19:371-379.
- Saez, J.M. 1994. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev.* 15:574-626.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.).* 230:1350-1354.
- Salicioni, A.M., M.D. Platt, E.V. Wertheimer, E. Arcelay, A. Allaire, J. Sosnik, and P.E. Visconti. 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 65:245-259.
- Sanchez-Cardenas, C., M.R. Servin-Vences, O. Jose, C.L. Trevino, A. Hernandez-Cruz, and A. Darszon. 2014. Acrosome reaction and Ca²⁺ imaging in single human spermatozoa: new regulatory roles of [Ca²⁺]_i. *Biol Reprod.* 91:6.
- Seeburg, P.H., A.J. Mason, T.A. Stewart, and K. Nikolics. 1987. The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. *Recent Prog Horm Res.* 43:69-98.
- Seftel, A. 2005. Male hypogonadism. Part II: etiology, pathophysiology, and diagnosis. *Int J Impot Res.* 18:223-228.
- Setchell, B.P. 2008. Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 636:212-233.
- Setchell, B.P., and G.M. Waites. 1970. Changes in the permeability of the testicular capillaries and of the 'blood-testis barrier' after injection of cadmium chloride in the rat. *J Endocrinol.* 47:81-86.
- Shah, A.S., Y. Ben-Shahar, T.O. Moninger, J.N. Kline, and M.J. Welsh. 2009. Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science.* 325:1131-1134.
- Sharp, P.A., B. Sugden, and J. Sambrook. 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry.* 12:3055-3063.
- Silva, A.J. 1997. Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. Banbury Conference on genetic background in mice. *Neuron.* 1997 Oct;19(4):755-9.

- Singh, A.P., and S. Rajender. 2015. CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod Biomed Online*. 30:28-38.
- Sklar, P.B., R.R. Anholt, and S.H. Snyder. 1986. The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells. Differential stimulation by distinct classes of odorants. *J Biol Chem*. 261:15538-15543.
- Smith, P.C., S. Firestein, and J.F. Hunt. 2002. The crystal structure of the olfactory marker protein at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol*. 319:807-821.
- Snell, G.D. 1978. Congenic resistant strains of mice. In "Origins of Inbred Mice". *Academic Press, New York*:1-31.
- Sofikitis, N., N. Giotitsas, P. Tsounapi, D. Baltogiannis, D. Giannakis, and N. Pardalidis. 2008. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 109:323-330.
- Spehr, M., G. Gisselmann, A. Poplawski, J.A. Riffell, C.H. Wetzel, R.K. Zimmer, and H. Hatt. 2003. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science*. 299:2054-2058.
- Spehr, M., and A. Schué. 2010. Sniffing Out the Secrets of Social Behavior.
- Spehr, M., K. Schwane, J.A. Riffell, R.K. Zimmer, and H. Hatt. 2006. Odorant receptors and olfactory-like signaling mechanisms in mammalian sperm. *Mol Cell Endocrinol*. 250:128-136.
- Spinaci, M., D. Bucci, M. Mazzoni, E. Giaretta, C. Bernardini, C. Vallorani, C. Tamanini, P. Clavenzani, and G. Galeati. 2014. Expression of alpha-gustducin and alpha-transducin, G proteins coupled with taste receptors, in boar sperm. *Theriogenology*. 82:144-151.
- Steebhorn, C., T.N. Litvin, L.R. Levin, J. Buck, and H. Wu. 2005. Bicarbonate activation of adenylyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment. *Nat Struct Mol Biol*. 12:32-37.
- Sternini, C., L. Anselmi, and E. Rozengurt. 2008. Enteroendocrine cells: a site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 15:73-78.
- Strünker, T., N. Goodwin, C. Brenker, N.D. Kashikar, I. Weyand, R. Seifert, and U.B. Kaupp. 2011. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature*. 471:382-386.
- Strünker, T., I. Weyand, W. Bonigk, Q. Van, A. Loogen, J.E. Brown, N. Kashikar, V. Hagen, E. Krause, and U.B. Kaupp. 2006. A K⁺-selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm. *Nat Cell Biol*. 8:1149-1154.
- Suarez, S.S., D.F. Katz, D.H. Owen, J.B. Andrew, and R.L. Powell. 1991. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod*. 44:375-381.
- Suarez, S.S., and A.A. Pacey. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*. 12:23-37.
- Sun, F., A. Bahat, A. Gakamsky, E. Girsh, N. Katz, L.C. Giojalas, I. Tur-Kaspa, and M. Eisenbach. 2005. Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. *Hum Reprod*. 20:761-767.
- Sundberg, J.P., and P.N. Schofield. 2009. A mouse by any other name. *J Invest Dermatol*. 129:1599-1601.
- Sutovsky, P. 2009. Sperm-egg adhesion and fusion in mammals. *Expert Rev Mol Med*. 1.
- Suzuki, T. 2007. Cellular mechanisms in taste buds. *Bull Tokyo Dent Coll*. 48:151-161.
- Svechnikov, K., L. Landreh, J. Weisser, G. Izzo, E. Colon, I. Svechnikova, and O. Soder. 2010. Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Horm Res Paediatr*. 73:93-101.
- Takeda, H., T. Ogasawara, T. Ozawa, A. Muraguchi, P.J. Jih, R. Morishita, M. Uchigashima, M. Watanabe, T. Fujimoto, T. Iwasaki, Y. Endo, and T. Sawasaki. 2015. Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay. *Sci Rep*. 5.

- Tanihara, F., M. Nakai, N.T. Men, N. Kato, H. Kaneko, J. Noguchi, T. Otoi, and K. Kikuchi. 2014. Roles of the zona pellucida and functional exposure of the sperm-egg fusion factor 'IZUMO' during in vitro fertilization in pigs. *Anim Sci J.* 85:395-404.
- Taruno, A., V. Vingtdoux, M. Ohmoto, Z. Ma, G. Dvoryanchikov, A. Li, L. Adrien, H. Zhao, S. Leung, M. Abernethy, J. Koppel, P. Davies, M.M. Civan, N. Chaudhari, I. Matsumoto, G. Hellekant, M.G. Tordoff, P. Marambaud, and J.K. Foskett. 2013. CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature.* 495:223-226.
- Temussi, P.A. 2009. Sweet, bitter and umami receptors: a complex relationship. *Trends in biochemical sciences.* 34:296-302.
- Tizzano, M., M. Cristofolletti, A. Sbarbati, and T.E. Finger. 2011. Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways. *BMC Pulm Med.* 11:1471-2466.
- Tizzano, M., B.D. Gulbransen, A. Vandenbeuch, T.R. Clapp, J.P. Herman, H.M. Sibhatu, M.E. Churchill, W.L. Silver, S.C. Kinnamon, and T.E. Finger. 2010. Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:3210-3215.
- Tomes, C.N., G.A. De Blas, M.A. Michaut, E.V. Farre, O. Cherhiti, P.E. Visconti, and L.S. Mayorga. 2005. alpha-SNAP and NSF are required in a priming step during the human sperm acrosome reaction. *Mol Hum Reprod.* 11:43-51.
- Tomes, C.N., M. Michaut, G. De Blas, P. Visconti, U. Matti, and L.S. Mayorga. 2002. SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction. *Dev Biol.* 243:326-338.
- Touhara, K., and L.B. Vosshall. 2009. Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors. *Annu Rev Physiol.* 71:307-332.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 76:4350-4354.
- Travis, A.J., and G.S. Kopf. 2002. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *The Journal of Clinical Investigation.* 110:731-736.
- Trotier, D. 2011. Vomeronasal organ and human pheromones. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 128:184-190.
- Trottmann, M., M. Dickmann, C.G. Stief, and A.J. Becker. 2010. [Laboratory work-up of testosterone]. *Urologe A.* 49:11-15.
- Ullmer, C., K. Schmuck, A. Figge, and H. Lubbert. 1998. Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein. *FEBS Lett.* 424:63-68.
- Vadakkadath Meethal, S., and C.S. Atwood. 2005. The role of hypothalamic-pituitary-gonadal hormones in the normal structure and functioning of the brain. *Cell Mol Life Sci.* 62:257-270.
- Vale, W., C. Rivier, and M. Brown. 1977. Regulatory peptides of the hypothalamus. *Annu Rev Physiol.* 39:473-527.
- Vennekens, R., J. Olausson, M. Meissner, W. Bloch, I. Mathar, S.E. Philipp, F. Schmitz, P. Weissgerber, B. Nilius, V. Flockerzi, and M. Freichel. 2007. Increased IgE-dependent mast cell activation and anaphylactic responses in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4. *Nat Immunol.* 8:312-320.
- Visconti, P.E., J.L. Bailey, G.D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke, and G.S. Kopf. 1995a. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development.* 121:1129-1137.
- Visconti, P.E., and G.S. Kopf. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod.* 59:1-6.

- Visconti, P.E., D. Krapf, J.L. de la Vega-Beltran, J.J. Acevedo, and A. Darszon. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl.* 13:395-405.
- Visconti, P.E., G.D. Moore, J.L. Bailey, P. Leclerc, S.A. Connors, D. Pan, P. Olds-Clarke, and G.S. Kopf. 1995b. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development.* 121:1139-1150.
- Visconti, P.E., J. Stewart-Savage, A. Blasco, L. Battaglia, P. Miranda, G.S. Kopf, and J.G. Tezon. 1999. Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol Reprod.* 61:76-84.
- Visconti, P.E., V.A. Westbrook, O. Chertihin, I. Demarco, S. Sleight, and A.B. Diekman. 2002. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol.* 53:133-150.
- Vjugina, U., and J.P. Evans. 2008. New insights into the molecular basis of mammalian sperm-egg membrane interactions. *Front Biosci.* 13:462-476.
- Voigt, A., J. Bojahr, M. Narukawa, S. Hubner, U. Boehm, and W. Meyerhof. 2015. Transsynaptic Tracing from Taste Receptor Cells Reveals Local Taste Receptor Gene Expression in Gustatory Ganglia and Brain. *J Neurosci.* 35:9717-9729.
- Voigt, A., S. Hubner, K. Lossow, I. Hermans-Borgmeyer, U. Boehm, and W. Meyerhof. 2012. Genetic labeling of Tas1r1 and Tas2r131 taste receptor cells in mice. *Chem Senses.* 37:897-911.
- Walensky, L.D., and S.H. Snyder. 1995. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol.* 130:857-869.
- Walker, W.H. 2011. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis.* 2011 Apr-Jun;1(2):116-20. doi:10.4161/spmg.1.2.16956.
- Wang, Z., and D.R. Storm. 2011. Maternal behavior is impaired in female mice lacking type 3 adenylyl cyclase. *Neuropsychopharmacology.* 36:772-781.
- Wassarman, P.M., and E.S. Litscher. 2008. Mammalian fertilization is dependent on multiple membrane fusion events. *Methods Mol Biol.* 475:99-113.
- Weber, E.M., B. Algers, J. Hultgren, and I.A. Olsson. 2013. Pup mortality in laboratory mice--infanticide or not? *Acta Vet Scand.* 55:1751-0147.
- Weber, E.M., and I.A.S. Olsson. 2008. Maternal behaviour in *Mus musculus* sp.: an ethological review. *Applied Animal Behaviour Science.* 114:1-22.
- Wennemuth, G., R.E. Westenbroek, T. Xu, B. Hille, and D.F. Babcock. 2000. CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca²⁺ channels in depolarization-evoked entry of Ca²⁺ into mouse sperm. *J Biol Chem.* 275:21210-21217.
- Witt, M., and T. Hummel. 2006. Vomeronasal versus olfactory epithelium: is there a cellular basis for human vomeronasal perception? *Int Rev Cytol.* 248:209-259.
- Wolfe, U., F.A. Elsholz, A. Kersten, B. Haarhaus, U. Schumacher, and C.M. Schempp. 2016. Expression and Functional Activity of the Human Bitter Taste Receptor TAS2R38 in Human Placental Tissues and JEG-3 Cells. *Molecules.* 21.
- Wong, G.T., K.S. Gannon, and R.F. Margolskee. 1996. Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature.* 381:796-800.
- Wong, S.T., K. Trinh, B. Hacker, G.C. Chan, G. Lowe, A. Gaggar, Z. Xia, G.H. Gold, and D.R. Storm. 2000. Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron.* 27:487-497.
- Wray, S. 2002. Molecular mechanisms for migration of placodally derived GnRH neurons. *Chem Senses.* 27:569-572.

- Wray, S., P. Grant, and H. Gainer. 1989. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:8132-8136.
- Xia, J., and D. Ren. 2009. Egg coat proteins activate calcium entry into mouse sperm via CATSPER channels. *Biol Reprod*. 80:1092-1098.
- Xie, B., J. Li, and W. Zhu. 2014. Pathological changes of testicular tissue in normal adult mice: A retrospective analysis. *Exp Ther Med*. 2014 Mar;7(3):654-6. Epub 2014 Jan 9 doi:10.3892/etm.2014.1481.
- Xu, J., J. Cao, N. Iguchi, D. Riethmacher, and L. Huang. 2013. Functional characterization of bitter-taste receptors expressed in mammalian testis. *Mol Hum Reprod*. 19:17-28.
- Yan, W., G. Sunavala, S. Rosenzweig, M. Dasso, J.G. Brand, and A.I. Spielman. 2001. Bitter taste transduced by PLC-beta(2)-dependent rise in IP(3) and alpha-gustducin-dependent fall in cyclic nucleotides. *Am J Physiol Cell Physiol*. 280:C742-751.
- Yanagimachi, R. 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*. 2:371-372.
- Yanagimachi, R. 2011. Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization? *Biol Reprod*. 85:4-5.
- Yanagimachi, R., and N. Usui. 1974. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res*. 89:161-174.
- Yang, H., P. Shi, Y.P. Zhang, and J. Zhang. 2005. Composition and evolution of the V2r vomeronasal receptor gene repertoire in mice and rats. *Genomics*. 86:306-315.
- Yin, W., and A.C. Gore. 2010. The hypothalamic median eminence and its role in reproductive aging. *Ann N Y Acad Sci*.
- Yoshiki, A., and K. Moriwaki. 2006. Mouse phenome research: implications of genetic background. *Ilar J*. 47:94-102.
- Young, A., M. Jiang, Y. Wang, N.B. Ahmedli, J. Ramirez, B.E. Reese, L. Birnbaumer, and D.B. Farber. 2011. Specific interaction of Galphai3 with the Oa1 G-protein coupled receptor controls the size and density of melanosomes in retinal pigment epithelium. *PLoS One*. 6:8.
- Youngentob, S.L., P.F. Kent, and F.L. Margolis. 2003. OMP gene deletion results in an alteration in odorant-induced mucosal activity patterns. *J Neurophysiol*. 90:3864-3873.
- Youngentob, S.L., M.M. Pyrski, and F.L. Margolis. 2004. Adenoviral vector-mediated rescue of the OMP-null behavioral phenotype: enhancement of odorant threshold sensitivity. *Behav Neurosci*. 118:636-642.
- Zancanaro, C., C.M. Caretta, F. Merigo, A. Cavaggioni, and F. Osculati. 1999. alpha-Gustducin expression in the vomeronasal organ of the mouse. *Eur J Neurosci*. 11:4473-4475.
- Zhang, Y., M.A. Hoon, J. Chandrashekar, K.L. Mueller, B. Cook, D. Wu, C.S. Zuker, and N.J. Ryba. 2003. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*. 112:293-301.
- Zhang, Y., M. Malekpour, N. Al-Madani, K. Kahrizi, M. Zanganeh, N.J. Lohr, M. Mohseni, F. Mojahedi, A. Daneshi, H. Najmabadi, and R.J. Smith. 2007. Sensorineural deafness and male infertility: a contiguous gene deletion syndrome. *J Med Genet*. 44:233-240.
- Zhang, Z. 2007. Gating mechanisms of transient receptor potential ion channels TRPM5 and TRPM4 in native and heterologous cells. *Dissertation, Faculty of the graduate school university of southern california*.
- Zhao, G.Q., Y. Zhang, M.A. Hoon, J. Chandrashekar, I. Erlenbach, N.J. Ryba, and C.S. Zuker. 2003. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*. 115:255-266.
- Zimmermann F, W.J., Reifenberg K. 2000. Breeding and assisted reproduction techniques, In "The handbook of experimental animals: the rat". *Academic Press, London*:177-198.

- Zufall, F., and S.D. Munger. 2001. From odor and pheromone transduction to the organization of the sense of smell.
Trends Neurosci. 24:191-193.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Regulation der Freisetzung männlicher Sexualhormone	11
Abbildung 2: Morphologie eines murinen Spermiums	12
Abbildung 3: Anatomischer Aufbau des Hodens und Nebenhodens der Maus und Keimzellentwicklungsstadien während der Spermatogenese	13
Abbildung 4: Spermienreifung und mögliche Mechanismen der Wegfindung zur Eizelle im weiblichen Genitaltrakt	14
Abbildung 5: Membranfusion während der Akrosomreaktion	17
Abbildung 6: Signalkaskade der Akrosomreaktion	19
Abbildung 7: Geschmackspapillen auf der Zunge	20
Abbildung 8: Geschmacksrezeptoren	23
Abbildung 9: Gustatorische Signalkaskade	24
Abbildung 10: Olfaktorische Organe und Rezeptoren	26
Abbildung 11: OR-vermittelte Signalweiterleitung in olfaktorischen Sinnesneuronen	28
Abbildung 12: Tas2r131-Colokalisation mit α -Gustducin in verschiedenen Geschmackspapillen	75
Abbildung 13: Untersuchungen zur Spezifität von anti-Tas2r131 Antikörpern	77
Abbildung 14: Genotypverteilung der Nachkommen geschlechtsspezifischer, homozygot defizienter Tas2r131-Zuchtpaare und die Analyse der Fertilitätsparameter	79
Abbildung 15: Sterblichkeitsrate der Nachkommen von heterozygoten und homozygoten Tas2r131-Zuchtpaaren	82
Abbildung 16: Expression der gustatorischen Signalproteine α -Gustducin und Tas2r131 in Hodengewebe und Spermien der Maus	85
Abbildung 17: Quantitative Analysen zur Hodenmorphologie von Tas2r131-defizienten Männchen	87
Abbildung 18: Vermessung Spermienkopf-bezogener Morphologieparameter an Tas2r131-defizienten Spermien	88
Abbildung 19: Quantitative Untersuchung der A23187-induzierten und spontanen Akrosomreaktion in Tas2r131-defizienten Spermien	92
Abbildung 20: Quantifizierung der <i>Zona pellucida</i> -induzierten Akrosomreaktion in Tas2r131-defizienten Spermien	93
Abbildung 21: Ratiometrische Ca^{2+} -Konzentrationsbestimmungen an isolierten Tas2r131 [-/-]-Spermien mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2AM	94
Abbildung 22: Kapazitierungsabhängige quantitative cAMP-Bestimmung in Tas2r131-defizienten Spermien	96
Abbildung 23: Nachweis von TRPM5-Transkripten in murinen Zungen- und Hodengewebe	99
Abbildung 24: TRPM5-Expression im männlichen Reproduktionsgewebe der Maus	101
Abbildung 25: Immunologische Verifizierung des TRPM5- <i>Knockouts</i>	102
Abbildung 26: Analyse der Fertilität von TRPM5-defizienten Mäusen	103
Abbildung 27: Quantifizierung der basalen Ca^{2+} -Konzentration und der spontanen Akrosomreaktionsrate in TRPM5-defizienten Spermien	105
Abbildung 28: Wahrscheinlichkeit der Genotyp-Kombinationen in Erbgängen mit zwei Merkmalen	106
Abbildung 29: Molekularbiologische Erfassung von TasR-TRPM5-defizienten Mäusen	107
Abbildung 30: Immunhistologische Verifizierung der gemeinsamen Deletion des Tas1r1 bzw. Tas2r131 und des TRPM5	109

Abbildung 31: Überlebensrate der Nachkommen von TasR-TRPM5 [-/-]-Zuchtpaaren.....	111
Abbildung 32: Kontrolle der akrosomalen Exozytosemaschinerie in TRPM5 [-/-]- und TasR-TRPM5 [-/-]-Spermien unter Verwendung des Ca^{2+} -Ionophors A23187	113
Abbildung 33: Spontane Akrosomreaktionsrate in TRPM5-defizienten- und TasR-TRPM5-defizienten Spermien	114
Abbildung 34: Vergleich der Kopfgrößen von TRPM5-defizienten- und TasR-TRPM5-defizienten Spermien	116
Abbildung 35: Altersabhängige Spermienanzahl-Bestimmung in TasR-TRPM5 [-/-]-Männchen ..	118
Abbildung 36: Quantifizierung apoptotischer Zellen in TRPM5- und TasR-TRPM5-defizienten Hodenschnitten	119
Abbildung 37: Vergleichende HE-Färbungen von C57BL/6N, TRPM5-defizienten und TasR-TRPM5-defizienten Hodengewebeschnitten	120
Abbildung 38: Massenspektrometrische Bestimmung der Testosteronkonzentration in Plasma TRPM5-defizienter Männchen	122
Abbildung 39: Immunologischer MUPP1-Nachweis in murinen Zungengewebe.....	126
Abbildung 40: Expression und Colokalisation von MUPP1 und TRPM5 im Nagermagen.....	127
Abbildung 41: RT-PCR Analysen zur Expression von OMP in der murinen Lunge	129
Abbildung 42: Proteinnachweis von OMP in der Lunge	130
Abbildung 43: Immunhistologischer Nachweis der OMP-Expression in der Lunge.....	131
Abbildung 44: mRNA-Expression des ACIII- und G_{olf} -Gens in verschiedenen Lungenzelltypen...	132
Abbildung 45: Coexpression von OMP und olfaktorischen Signalproteinen in Lungenzellen.....	133
Abbildung 46: mRNA basierender Nachweis der TRPM5-Expression in der Lunge.....	135
Abbildung 47: <i>In situ</i> RT-PCR an humanen Lungenschnitten mit Primern chemosensorischer Marker	136
Abbildung 48: Immunhistochemischer Nachweis von TRPM5 in der murinen Lunge	138
Abbildung 49: Genetischer Hintergrund.....	141
Abbildung 50: Mögliche Ursachen der <i>transmission ratio distortion</i>	145

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Programm einer Standard-PCR.....	47
Tabelle 2: In situ RT-PCR Programm für Reverse Transkription und Amplifikation.....	48
Tabelle 3: PCR-Programm zur Genotypisierung der Mauslinien Tas1r1 ^{BL-IRES-mCherry} und Tas2r131 ^{BL-IRES-hrGFP}	51
Tabelle 4: PCR-Programm zur Genotypisierung der TRPM5- <i>knockout</i> -Mauslinie.....	51
Tabelle 5: Fertilität von Tas2r131-defizienten Mäusen.	80
Tabelle 6: Prozentuale Anteile der Geschlechterhäufigkeit in der F1-Generation bezogen auf den beobachteten Genotyp von Nachkommen aus geschlechtsspezifischen Tas2r131-Verpaarungen	81
Tabelle 7: Auswirkung der Tas2r131-Defizienz auf das Körper- und Hodengewicht sowie die Spermienanzahl und Serumtestosteronkonzentration von männlichen Mäusen.	90
Tabelle 8: Analyse der Fertilitätsparameter von TasR-TRPM5-defizienten Verpaarungen.....	110
Tabelle 9: Auswirkungen der Deletion gustatorischer Signalproteine auf die männlichen Reproduktionsorgane.....	117

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AC	Adenylatzyklase
Abb.	Abbildung
AM	Acetoxymethylester
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ABP	Adrogen binding protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ₂₊	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CASA	<i>Computer assisted semen analysis</i>
CatSper	<i>Cation channels of sperm</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CV	Circumvallate Papille (Wallpapille)
Da	Dalton
DAG	1,2-Diacylglycerin
DAPI	4',6'-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
dUTP	Desoxy-Uridintriphosphat
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzym-Immunassay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EPAC	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>
ENAC	<i>Epithelial Na⁺-channel</i>
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
G _{olf}	Olfaktorisches G-Proteine
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
ddH ₂ O	Demineralisiertes Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Essigsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin
hrGFP	<i>Humanized renilla green fluorescent protein</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>

Hz	Hertz
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IgG	Immunglobuline
INAD	<i>Inactivation no after potential D</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K ⁺	Kalium
Ki	Knock-In
KO	Knockout
LH	Luteinisierendes Hormon
LSM	<i>Laser Scanning Microscope</i>
M	Molar
mA	Milliampère
MetOH	Methanol
mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mn(OAc) ₂	Mangan(III)-acetat
mRNA	Messenger RNA
ms	Millisekunde
MUPP1	Multi-PDZ Domänen Protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Na ⁺	Natrium
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
NGS	Normales Ziegenserum
nM	Nanomolar
OMP	Olfaktorisches Marker Protein
OR	Olfaktorischer Rezeptor
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCA	Perchlorsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIP ₂	Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKD2L1	<i>Polycystic kidney disease 2-like 1 protein</i>
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNA	Peanut agglutinin
rcf	Relative Zentrifugalkraft
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
rpm	Umdrehung pro Minute
sek	Sekunde
sAC	Lösliche Adenylatzyklase
SDS	Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate poly-acrylamid gel-electrophoresis</i>
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
Stim	<i>Stromal interaction molecule</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TdT	terminale Desoxyribosyl-Transferase
TRITC	Tetramethylrhodamin-isothiocyanat
TPPO	Triphenylphosphinoxid
TPC	<i>Two pore channel</i>
TRPM5	<i>Transient receptor potential cation channel, subfamily M</i>
u. a.	Unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
VNO	Vomeronasal Organ
z. B.	Zum Beispiel
ZP	<i>Zona pellucida</i>

Eidesstattliche Versicherung

Wartenberg, Andrea

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Studien zur Expression und funktionellen Bedeutung von Geschmacksrezeptoren und dem gustatorischen Kationenkanal TRPM5 im murinen männlichen Reproduktionssystem“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand